

ASAP!

DATE \_\_\_\_\_

APPLICATION NUMBER 10/531,572

DOC CODE PPH Petition  
REQUEST

DOC DATE 9/17/2007

DELIVER THE ATTACHED FILE/DOCUMENT TO THE TC  
SCANNING CENTER

CONTRACTOR: THE ATTACHED FILE/DOCUMENT MUST BE  
INDEXED AND SCANNED INTO IFW WITHIN 8 WORK HOURS;  
UPLOADING OF THE SCANNED IMAGES SHOULD OCCUR NO  
LATER THAN 16 WORK HOURS  
FOLLOWING RECEIPT OF THIS REQUEST

AFTER SCANNING, ORIGINAL DOCUMENTS SHOULD BE BOXED IN  
ACCORDANCE WITH INSTRUCTIONS

Best Available Copy

**FITZPATRICK, CELLA, HARPER & SCINTO**

30 Rockefeller Plaza  
New York, NY 10112-3801  
(212) 218-2100

Facsimile: (212) 218-2200

**FACSIMILE COVER SHEET**

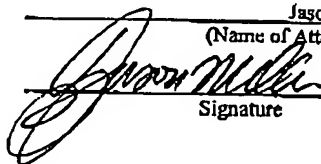
<b>TO:</b>	The Office of the Commissioner of Patents Attn: MAGDALEN GREENLIEF		
<b>FROM:</b>	Jason M. Okun		
<b>RE:</b>	U.S. Pat. Appln. 10/531,572 Our Ref.: 03500.017652		
<b>FAX NO.:</b>	571-273-0125		
<b>DATE:</b>	September 17, 2007	<b>NO. OF PAGES:</b>	263 (including cover page)
<b>TIME:</b>	<b>SENT BY:</b>		

**MESSAGE**

I hereby certify that this correspondence is being facsimile transmitted to  
the United States Patent and Trademark Office, Fax No. 1-571-273-0125  
on September 17, 2007  
(Date of Facsimile Transmission)

Jason M. Okun

(Name of Attorney for Applicant)



Signature

September 17, 2007

Date of Signature

**IF YOU DO NOT RECEIVE ALL THE PAGES  
PLEASE CALL 212-218-2100 AS SOON AS POSSIBLE.**

**Note:** We are transmitting from a Canon Model FAX-L770  
(compatible with any Group I, Group II or Group III machine).

THIS FACSIMILE MESSAGE AND ACCOMPANYING DOCUMENTS ARE INTENDED ONLY FOR THE USE OF THE ADDRESSEE INDICATED ABOVE. INFORMATION THAT IS PRIVILEGED OR OTHERWISE CONFIDENTIAL MAY BE CONTAINED THEREIN. IF YOU ARE NOT THE INTENDED RECIPIENT, YOU ARE HEREBY NOTIFIED THAT ANY DISSEMINATION, REVIEW OR USE OF THIS MESSAGE, DOCUMENTS OR INFORMATION CONTAINED THEREIN IS STRICTLY PROHIBITED. IF YOU HAVE RECEIVED THIS MESSAGE IN ERROR, PLEASE NOTIFY US IMMEDIATELY BY TELEPHONE OR FACSIMILE AND MAIL THE ORIGINAL TO US AT THE ABOVE ADDRESS. THANK YOU.

Best Available Copy

03500.017652

PATENT APPLICATION

## IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

In re Application of:

TAKASHI KENMOKU ET AL.

Application No.: 10/531,572

Int'l Application No. PCT/JP03/13530

Filed: October 23, 2003

For: NEW  
POLYHYDROXYALKANOATE  
COMPRISING UNIT HAVING  
(PHENYLMETHYL)OXY  
STRUCTURE ON SIDE CHAIN  
THEREOF, AND METHOD FOR  
PRODUCING THE SAME

Examiner: S.M. Hanley

Group Art Unit: 1651

Confirmation No. 2325

September 17, 2007

Commissioner for Patents  
P.O. Box 1450  
Alexandria, VA 22313-1450

LETTER SUBMITTING PAPERS UNDER PPH PILOT PROGRAM

Sir:

Applicants hereby request accelerated examination of the above-identified application under the Patent and Trademark Office's Patent Prosecution Highway (PPH) Pilot Program based on allowed claims of the Japanese application from which the present application claims priority under 35 U.S.C. § 119. Submitted herewith are the following documents for the accelerated examination:

I hereby certify that this correspondence is being facsimile transmitted to  
the United States Patent and Trademark Office, Fax No. 1-571-273-0125  
on September 17, 2007  
(Date of Facsimile Transmission)

Jason M. Okun

(Name of Attorney for Applicant)

  
SignatureSeptember 17, 2007  
Date of Signature

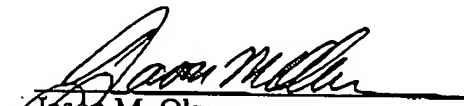
Best Available Copy

- 1) Request For Participation in PPH Pilot Program (Form PTO/SB/20)
- 2) JP 3880566 B2, including Japanese Final (granted) Claims (in Japanese)
- 3) English translation of Japanese Final (granted) Claims
- 4) Japanese Office Action (Reasons for Refusal; in Japanese)
- 5) English translation of Japanese Office Action
- 6) Verification of translations
- 7) Preliminary Amendment
- 8) Information Disclosure Statement (with 5 cited documents)

While it is not believed that a separate Petition to make special is required and that the Request (document 1) fulfills the requirements for such a Petition, should the Office determine that a separate Petition is required, this Letter should be treated as a Petition to make the application special under the Office's PPH Pilot Program. As set forth in the Request, the Petition fee should be charged to Deposit Account 06-1205.

Applicants' undersigned attorney may be reached in our New York office by telephone at (212) 218-2100. All correspondence should continue to be directed to our address given below.

Respectfully submitted,

  
Jason M. Okun  
Attorney for Applicants  
Registration No. 48,512

FITZPATRICK, CELLA, HARPER & SCINTO  
30 Rockefeller Plaza  
New York, New York 10112-3800  
Facsimile: (212) 218-2200

FCMS\_WS 1590484v1



PTO/SB/20 (09-07)

Approved for use through 12/31/2008. OMB 0851-0058

U.S. Patent and Trademark Office; U.S. DEPARTMENT OF COMMERCE

Under the Paperwork Reduction Act of 1995, no persons are required to respond to a collection of information unless it displays a valid OMB control number.

**REQUEST FOR PARTICIPATION IN THE PATENT PROSECUTION HIGHWAY (PPH) PILOT PROGRAM  
BETWEEN THE (1) JPO OR (2) UKIPO, AND THE USPTO**

Application No.:	10/531,572	First Named Inventor:	TAKASHI KENMOKU
Filing Date:	October 23, 2003	Attorney Docket No.:	03500.017652
Title of the Invention:	NEW POLYHYDROXYALKANOATE COMPRISING UNIT HAVING (PHENYLMETHYL)OXY STRUCTURE ON SIDE CHAIN THEREOF, AND METHOD FOR PRODUCING THE SAME		

THIS REQUEST FOR PARTICIPATION IN THE PPH PILOT PROGRAM MUST BE FAXED TO:  
THE OFFICE OF THE COMMISSIONER FOR PATENTS AT 571-273-0125 DIRECTED TO THE ATTENTION OF MAGDALEN GREENLIEF

APPLICANT HEREBY REQUESTS PARTICIPATION IN THE PATENT PROSECUTION HIGHWAY (PPH) PILOT PROGRAM AND PETITIONS TO MAKE THE ABOVE-IDENTIFIED APPLICATION SPECIAL UNDER THE PPH PILOT PROGRAM.

The above-identified application validly claims priority under 35 U.S.C. 119(a) and 37 CFR 1.55 to one or more corresponding JPO application(s) or UKIPO application(s).

The ☒ JPO ☐ UKIPO application number(s) is/are: 2003-356749

The filing date of the ☒ JPO ☐ UKIPO application(s) is/are: October 16, 2003

**I. List of Required Documents:**

- a. A copy of all JPO office actions (excluding "Decision to Grant a Patent") in the above-identified JPO application(s), or a copy of all UKIPO office actions in the above-identified UKIPO application(s).

☒ Is attached.

☐ Is available via Dossier Access System. Applicant hereby requests that the USPTO obtain these documents via the Dossier Access System.

"It is not necessary to submit a copy of the "Decision to Grant a Patent" and an English translation thereof.

- b. A copy of all claims which were determined to be patentable by the JPO in the above-identified JPO application(s), or a copy of all claims which were determined to be patentable by the UKIPO in the above-identified UKIPO application(s).

☒ Is attached.

☐ Is available via Dossier Access System. Applicant hereby requests that the USPTO obtain these documents via the Dossier Access System.

- c. English translations (where applicable) of the documents in a. and b. above along with a statement that the English translations are accurate are attached.

Information disclosure statement listing the documents cited in the JPO office actions or UKIPO office actions is attached.

Copies of all documents are attached except for U.S. patents or U.S. patent application publications.

[Page 1 of 2]

This collection of information is required by 35 U.S.C. 119, 37 CFR 1.55, and 37 CFR 1.102(d). The information is required to obtain or retain a benefit by the public, which is to file (and by the USPTO to process) an application. Confidentiality is governed by 35 U.S.C. 122 and 37 CFR 1.11 and 1.14. This collection is estimated to take 2 hours to complete, including gathering, preparing, and submitting the completed application form to the USPTO. Time will vary depending upon the individual case. Any comments on the amount of time you require to complete this form and/or suggestions for reducing this burden should be sent to the Chief Information Officer, U.S. Patent and Trademark Office, U.S. Department of Commerce, P.O. Box 1450, Alexandria, VA 22313-1450. DO NOT SEND FEES OR COMPLETED FORMS TO THIS ADDRESS. FAX COMPLETED FORMS TO: Office of the Commissioner for Patents at 571-273-0125, Attention: Magdalen Greenleaf.

PTO/SB/20 (08-07)

Approved for use through 12/31/2008. OMB 0651-0058  
U.S. Patent and Trademark Office; U.S. DEPARTMENT OF COMMERCE

Under the Paperwork Reduction Act of 1995, no persons are required to respond to a collection of information unless it displays a valid OMB control number.

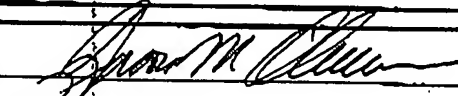
**REQUEST FOR PARTICIPATION IN THE PATENT PROSECUTION HIGHWAY (PPH) PILOT PROGRAM  
BETWEEN THE (1) JPO OR (2) UKIPO, AND THE USPTO**  
(continued)

Application No.: 10/531,572 First Named Inventor: TAKASHI KENMOKU

**II. Claims Correspondence Table:**

Claims in US Application	Patentable Claims in JP/UKIPO Application	Explanation regarding the correspondence
21	1	Both claims are the same.
22	2	Both claims are the same.
23	3	Japanese claim 3 depends on claim 1 or 2. U.S. claim 23 depends only on claim 21.
24	4	Japanese claim 4 depends on any one of claims 1-3. U.S. claim 24 depends only on claim 21.
25	5	Both claims are the same.
26	6	Both claims are the same.
27	7	Japanese claim 7 depends on claim 5 or 6. U.S. claim 27 depends only on claim 25.
28	8	Japanese claim 8 depends on any one of claims 5-7. U.S. claim 28 depends only on claim 25.  (SEE ATTACHED SHEET FOR CLAIMS 29-37)

**III. All the claims in the US application sufficiently correspond to the patentable/allowable claims in the JPO or UKIPO application.****IV. Payment of Fees:**The Commissioner is hereby authorized to charge the petition fee under 37 CFR 1.17(h) as required by 37 CFR 1.102(d) to ☒ Deposit Account No. 06-1205☐ Credit Card. Credit Card Payment Form (PTO-2038) is attached.

Signature 	Date September 14, 2007
Name (Print/Typed) Jason M. Okun	Registration Number 48,512

Continuation Sheet for Page 2 (Form PTO/SB/20)  
Application No. 10/531,572

Claims in US Application	Patentable Claims in JP/UKIPO Application	Explanation regarding the correspondence
29	9	Japanese claim 9 depends on any one of claims 5-8. U.S. claim 29 depends only on claim 25.
30	10	Japanese claim 10 depends on claim 8, which is multiply dependent, as noted above. U.S. claim 30 depends on claim 29, which is not multiply dependent.
31	11	Japanese claim 11 depends on claim 9 or 10. U.S. claim 31 depends only on claim 29.
32	12	Japanese claim 12 depends on claim 11, which is multiply dependent, as noted above. U.S. claim 32 depends on claim 31, which is not multiply dependent.
33	13	Japanese claim 13 depends on any one of claims 9-12. U.S. claim 33 depends only on claim 29.
34	14	Japanese claim 14 depends on claim 13, which is multiply dependent, as noted above. U.S. claim 34 depends on claim 33, which is not multiply dependent.
35	15	Japanese claim 15 depends on any one of claims 9-14. U.S. claim 35 depends only on claim 29.
36	16	Japanese claim 16 depends on any one of claims 5-15. U.S. claim 36 depends only on claim 25.
37	17	Japanese claim 17 depends on claim 16, which is multiply dependent, as noted above. U.S. claim 37 depends on claim 36, which is not multiply dependent.

I hereby certify that this correspondence is being  
facsimile transmitted to the United States Patent and  
Trademark Office, Fax No. 1-571-273-0125 on  
September 17, 2007

(Date of Facsimile Transmission)

Jason M. Okun

(Name of Attorney for Applicants)

  
Signature

September 17, 2007  
Date of Signature

**WARNING:**

Petitioner/applicant is cautioned to avoid submitting personal information in documents filed in a patent application that may contribute to identity theft. Personal information such as social security numbers, bank account numbers, or credit card numbers (other than a check or credit card authorization form PTO-2038 submitted for payment purposes) is never required by the USPTO to support a petition or an application. If this type of personal information is included in documents submitted to the USPTO, petitioners/applicants should consider redacting such personal information from the documents before submitting them to the USPTO. Petitioner/applicant is advised that the record of a patent application is available to the public after publication of the application (unless a non-publication request in compliance with 37 CFR 1.213(a) is made in the application) or issuance of a patent. Furthermore, the record from an abandoned application may also be available to the public if the application is referenced in a published application or an issued patent (see 37 CFR 1.14). Checks and credit card authorization forms PTO-2038 submitted for payment purposes are not retained in the application file and therefore are not publicly available.

**Privacy Act Statement**

The Privacy Act of 1974 (P.L. 93-579) requires that you be given certain information in connection with your submission of the attached form related to a patent application or patent. Accordingly, pursuant to the requirements of the Act, please be advised that: (1) the general authority for the collection of this information is 35 U.S.C. 2(b)(2); (2) furnishing of the information solicited is voluntary; and (3) the principal purpose for which the information is used by the U.S. Patent and Trademark Office is to process and/or examine your submission related to a patent application or patent. If you do not furnish the requested information, the U.S. Patent and Trademark Office may not be able to process and/or examine your submission, which may result in termination of proceedings or abandonment of the application or expiration of the patent.

The information provided by you in this form will be subject to the following routine uses:

1. The information on this form will be treated confidentially to the extent allowed under the Freedom of Information Act (5 U.S.C. 552) and the Privacy Act (5 U.S.C. 552a). Records from this system of records may be disclosed to the Department of Justice to determine whether disclosure of these records is required by the Freedom of Information Act.
2. A record from this system of records may be disclosed, as a routine use, in the course of presenting evidence to a court, magistrate, or administrative tribunal, including disclosures to opposing counsel in the course of settlement negotiations.
3. A record in this system of records may be disclosed, as a routine use, to a Member of Congress submitting a request involving an individual, to whom the record pertains, when the individual has requested assistance from the Member with respect to the subject matter of the record.
4. A record in this system of records may be disclosed, as a routine use, to a contractor of the Agency having need for the information in order to perform a contract. Recipients of information shall be required to comply with the requirements of the Privacy Act of 1974, as amended, pursuant to 5 U.S.C. 552a(m).
5. A record related to an International Application filed under the Patent Cooperation Treaty in this system of records may be disclosed, as a routine use, to the International Bureau of the World Intellectual Property Organization, pursuant to the Patent Cooperation Treaty.
6. A record in this system of records may be disclosed, as a routine use, to another federal agency for purposes of National Security review (35 U.S.C. 181) and for review pursuant to the Atomic Energy Act (42 U.S.C. 218(c)).
7. A record from this system of records may be disclosed, as a routine use, to the Administrator, General Services, or his/her designee, during an inspection of records conducted by GSA as part of that agency's responsibility to recommend improvements in records management practices and programs, under authority of 44 U.S.C. 2904 and 2906. Such disclosure shall be made in accordance with the GSA regulations governing inspection of records for this purpose, and any other relevant (i.e., GSA or Commerce) directive. Such disclosure shall not be used to make determinations about individuals.
8. A record from this system of records may be disclosed, as a routine use, to the public after either publication of the application pursuant to 35 U.S.C. 122(b) or issuance of a patent pursuant to 35 U.S.C. 151. Further, a record may be disclosed, subject to the limitations of 37 CFR 1.14, as a routine use, to the public if the record was filed in an application which became abandoned or in which the proceedings were terminated and which application is referenced by either a published application, an application open to public inspection or an issued patent.
9. A record from this system of records may be disclosed, as a routine use, to a Federal, State, or local law enforcement agency, if the USPTO becomes aware of a violation or potential violation of law or regulation.

Best Available Copy

## IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

In re PATENT APPLICATION of

Inventor: Takashi KENMOKU, et al.

Application No. 10/531,572

Title: NEW POLYHYDROXYALKANOATE COMPRISING UNIT HAVING (PHENYLMETHYL)OXY  
STRUCTURE ON SIDE CHAIN THEREOF, AND METHOD FOR PRODUCING THE SAMEVERIFIED TRANSLATION OF DOCUMENTS CONCERNING JAPANESE PATENT APPLICATION

I, SHINICHI USUI, a Japanese Patent Attorney registered No. 9694, of Okabe International Patent Office at No. 602, Fuji Bldg., 2-3, Marunouchi 3-chome, Chiyoda-ku, Tokyo, Japan, hereby declare under penalty of perjury under the laws of the United States of America that I have a thorough knowledge of Japanese and English languages, and that the attached are accurate translations of the documents listed below concerning Japanese Patent Application No. 2003-356749:

Final Claims

Notification of Reason for Refusal

Signed this 14th day of September, 2007

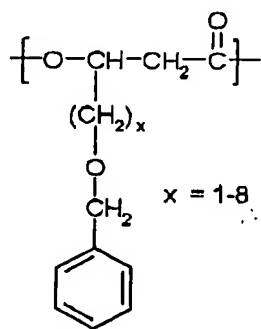


SHINICHI USUI

1

## CLAIMS GRANTED IN PRIORITY APPLICATION

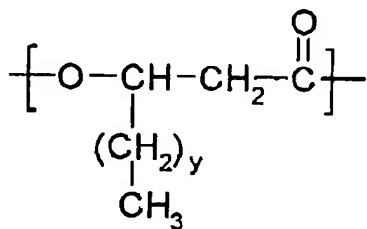
1. A polyhydroxyalkanoate comprising a monomer unit of 3-hydroxy- $\omega$ -(phenylmethyl)oxyalkanoic acid expressed by chemical formula (1):



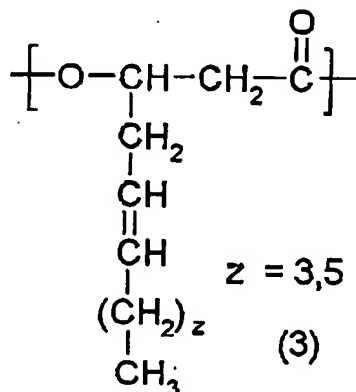
(1)

wherein x can be one or more integers within the range shown in the chemical formula.

2. The polyhydroxyalkanoate according to claim 1, comprising at least one unit expressed by chemical formula selected from the group consisting of chemical formulas (2) and (3):

 $y = 1-8$ 

(2)

 $z = 3,5$ 

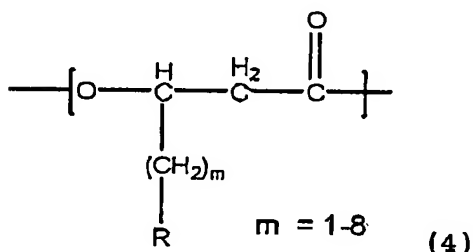
(3)

2

wherein y and z can be one or more integers within the range shown in the chemical formulas, while being independent from the monomer unit expressed by chemical formula (1).

5

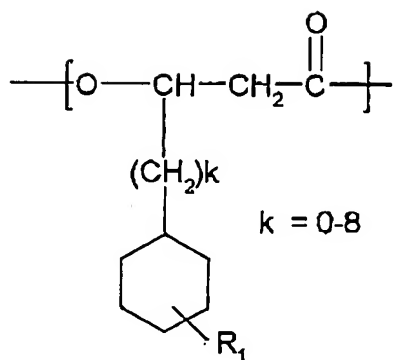
3. The polyhydroxyalkanoate according to claim 1 or 2, comprising simultaneously, in at least a molecule thereof, the monomer of 3-hydroxy- $\omega$ -[(phenylmethyl)oxy]alkanoic acid expressed by chemical formula (1) and a unit expressed by chemical formula (4):



wherein m can be one or more integers within the range shown in the chemical formula, and R comprises a residue having either a phenyl structure or a thienyl structure, or a 3-hydroxy- $\omega$ -cyclohexylalkanoic acid unit expressed by chemical formula (5):

15

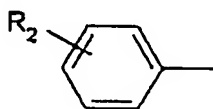
3



(5)

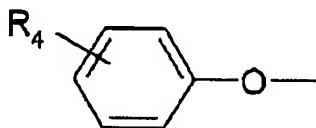
wherein  $\text{R}_1$  is H, CN,  $\text{NO}_2$ , halogen,  $\text{CH}_3$ ,  $\text{C}_2\text{H}_5$ ,  $\text{C}_3\text{H}_7$ ,  $\text{CF}_3$ ,  $\text{C}_2\text{F}_5$  and  $\text{C}_3\text{F}_7$ , and  $k$  can be one or more integers within the range shown in the chemical formula,

5 wherein  $\text{R}$  in chemical formula (4), i.e. a residue having either a phenyl structure or a thienyl structure, is at least one group selected from the group consisting of residues



(8)

10 wherein  $\text{R}_2$  is H, halogen, CN,  $\text{NO}_2$ ,  $\text{CH}_3$ ,  $\text{C}_2\text{H}_5$ ,  $\text{C}_3\text{H}_7$ ,  $\text{CH}=\text{CH}_2$ ,  $\text{COOR}_3$  (wherein  $\text{R}_3$  represents any one selected from the group consisting of H, Na and K),  $\text{CF}_3$ ,  $\text{C}_2\text{F}_5$  and  $\text{C}_3\text{F}_7$ , and in a case where there exist a plurality of units,  $\text{R}_2$  may be different for each unit;

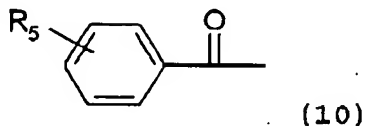


(9)

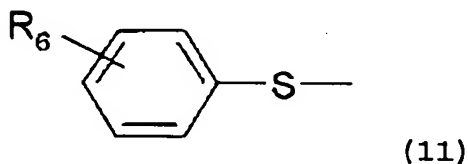
15 wherein  $\text{R}_4$  is selected from the group consisting of H, halogen, CN,  $\text{NO}_2$ ,  $\text{CH}_3$ ,  $\text{C}_2\text{H}_5$ ,  $\text{C}_3\text{H}_7$ ,  $\text{SCH}_3$ ,  $\text{CF}_3$ ,  $\text{C}_2\text{F}_5$  and



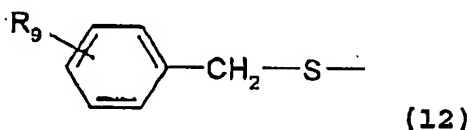
$C_3F_7$ , and in a case where there exist a plurality of units,  $R_4$  may be different for each unit;



wherein  $R_5$  is selected from the group consisting of H,  
5 halogen, CN,  $NO_2$ ,  $CH_3$ ,  $C_2H_5$ ,  $C_3H_7$ ,  $CF_3$ ,  $C_2F_5$  and  $C_3F_7$ ,  
and in a case where there exist a plurality of units,  
 $R_5$  may be different for each unit;



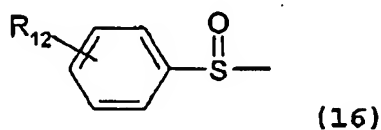
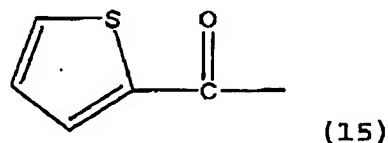
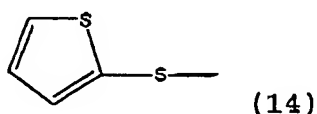
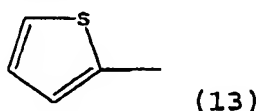
wherein  $R_6$  is selected from the group consisting of H,  
10 halogen, CN,  $NO_2$ ,  $COOR_7$ ,  $SO_2R_8$  (wherein  $R_7$  represents  
any one selected from the group consisting of H, Na,  
K,  $CH_3$  and  $C_2H_5$ , and  $R_8$  represents any one selected  
from the group consisting of OH, ONa, OK, halogen,  
OCH<sub>3</sub> and OC<sub>2</sub>H<sub>5</sub>),  $CH_3$ ,  $C_2H_5$ ,  $C_3H_7$ ,  $(CH_3)_2-CH$ , and  $(CH_3)_3-$   
15 C, and in a case where there exist a plurality of  
units,  $R_6$  may be different for each unit;



wherein  $R_9$  represents a substituent group on the  
aromatic ring,  $R_9$  is selected from the group  
20 consisting of H, halogen, CN,  $NO_2$ ,  $COOR_{10}$ ,  $SO_2R_{11}$   
(wherein  $R_{10}$  represents any one selected from the

5

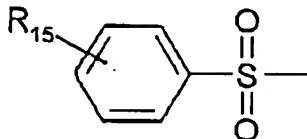
group consisting of H, Na, K, CH<sub>3</sub> and C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>, and R<sub>11</sub> represents any one selected from the group consisting of OH, ONa, OK, halogen, OCH<sub>3</sub> and OC<sub>2</sub>H<sub>5</sub>, CH<sub>3</sub>, C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>, C<sub>3</sub>H<sub>7</sub>, (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>-CH and (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>-C, and in a case where there exist a plurality of units, R<sub>9</sub> may be different for each unit;



wherein R<sub>12</sub> is selected from the group consisting of H, halogen, CN, NO<sub>2</sub>, COOR<sub>13</sub>, SO<sub>2</sub>R<sub>14</sub> (wherein R<sub>13</sub> represents any one selected from the group consisting of H, Na, K, CH<sub>3</sub> and C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>, and R<sub>14</sub> represents any one selected from the group consisting of OH, ONa, OK, halogen, OCH<sub>3</sub> and OC<sub>2</sub>H<sub>5</sub>, CH<sub>3</sub>, C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>, C<sub>3</sub>H<sub>7</sub>, (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>-CH and (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>-C, and in a case where there exist a plurality of units,

6

$R_{12}$  may be different for each unit; and



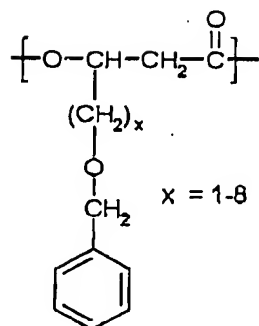
(17)

wherein  $R_{15}$  is selected from the group consisting of H, halogen, CN,  $\text{NO}_2$ ,  $\text{COOR}_{16}$ ,  $\text{SO}_2\text{R}_{17}$  (wherein  $R_{16}$  represents any one selected from the group consisting of H, Na, K,  $\text{CH}_3$  and  $\text{C}_2\text{H}_5$ , and  $R_{17}$  represents any one selected from the group consisting of OH, ONa, OK, halogen,  $\text{OCH}_3$  and  $\text{OC}_2\text{H}_5$ ),  $\text{CH}_3$ ,  $\text{C}_2\text{H}_5$ ,  $\text{C}_3\text{H}_7$ ,  $(\text{CH}_3)_2\text{-CH}$  and  $(\text{CH}_3)_3\text{-C}$ , and in a case where there exist a plurality of units,  $R_{15}$  may be different for each unit.

4. The polyhydroxyalkanoate according to any one of claims 1 to 3, wherein a number average molecular weight is within the range between 1000 and 1000000.

5. A method for producing a polyhydroxyalkanoate comprising, in a molecule thereof, a monomer unit of 3-hydroxy- $\omega$ -[(phenylmethyl)oxy]alkanoic acid unit expressed by chemical formula (1):

7

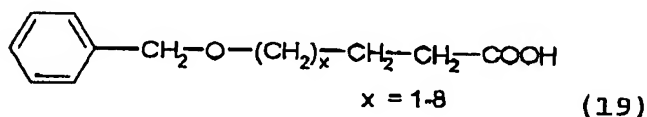


(1)

wherein x can be one or more integers within the range shown in the chemical formula, which comprises allowing a microorganism with an ability to produce a polyhydroxyalkanoate comprising in a molecule thereof the monomer unit of 3-hydroxy- $\omega$ -

[(phenylmethyl)oxy]alkanoic acid expressed by chemical formula (1) to biosynthesize the polyhydroxyalkanoate from  $\omega$ -

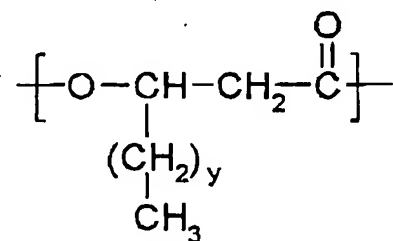
[(phenylmethyl)oxy]alkanoic acid expressed by chemical formula (19):



wherein x can be one or more integers within the range shown in the chemical formula as a raw material under a condition which comprises the  $\omega$ -[(phenylmethyl)oxy]alkanoic acid expressed by chemical formula (19).

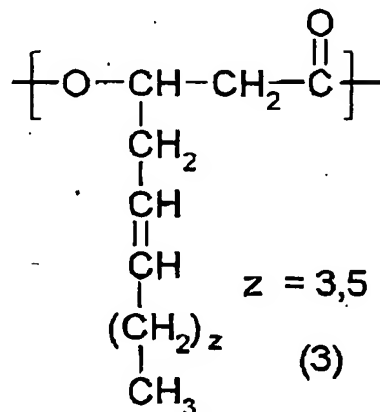
6. The method for producing a polyhydroxyalkanoate

according to claim 5, wherein the polyhydroxyalkanoate comprises at least one unit expressed by the following chemical formulas (2) and (3):



y = 1-8

(2)



z = 3,5

(3)

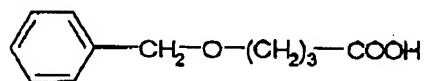
5

wherein y and z can be one or more integers within the range shown in the chemical formulas, while being independent from the unit expressed by chemical formula (1).

10

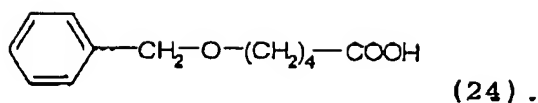
7. The method for producing a polyhydroxyalkanoate according to claim 5 or 6, wherein the ω-[(phenylmethyl)oxy]alkanoic acid expressed by said chemical formula (19) is 4-[(phenylmethyl)oxy]butyric acid expressed by chemical formula (23):

15

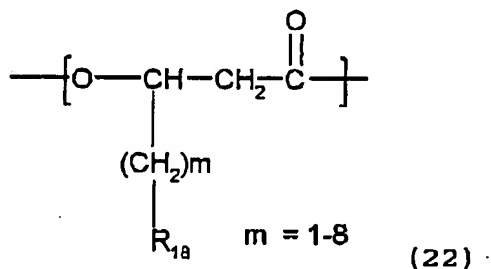


(23)

or 5-[(phenylmethyl)oxy]valeric acid expressed by chemical formula (24):

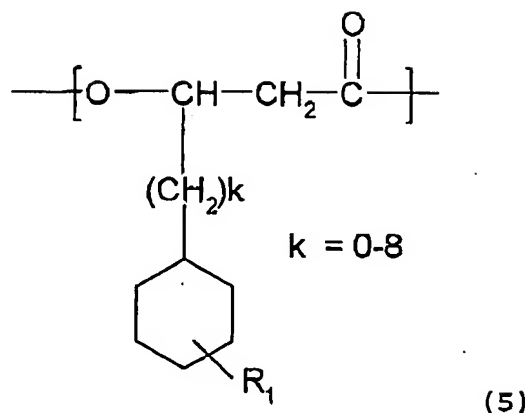


8. The method for producing a polyhydroxyalkanoate according to any one of claims 5 to 7, comprising  
 5 allowing the microorganism with an ability to produce a polyhydroxyalkanoate comprising simultaneously, in at least a molecule thereof, the monomer unit of 3-hydroxy- $\omega$ -[(phenylmethyl)oxy]alkanoic acid expressed by chemical formula (1) and  
 10 a 3-hydroxy-alkanoic acid unit expressed by chemical formula (22):



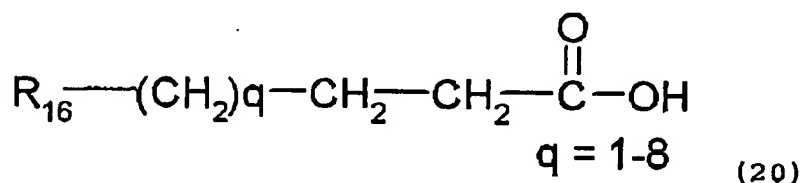
- wherein m can be one or more integers within the range shown in the chemical formula, and R<sub>18</sub> comprises  
 15 a residue having either a phenyl structure or a thienyl structure, or 3-hydroxy- $\omega$ -cyclohexylalkanoic acid unit expressed by chemical formula (5):

10



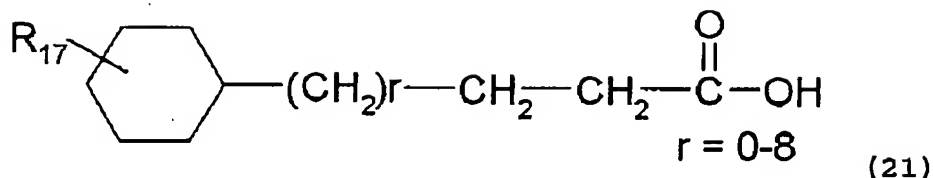
wherein  $\text{R}_1$  is selected from the group consisting of H, CN,  $\text{NO}_2$ , halogen,  $\text{CH}_3$ ,  $\text{C}_2\text{H}_5$ ,  $\text{C}_3\text{H}_7$ ,  $\text{CF}_3$ ,  $\text{C}_2\text{F}_5$  and  $\text{C}_3\text{F}_7$ , and  $k$  can be one or more integers within the range shown in the chemical formula,

from  $\omega$ -[(phenylmethyl)oxy]alkanoic acid expressed by chemical formula (19), and a alkanolic acid expressed by chemical formula (20):

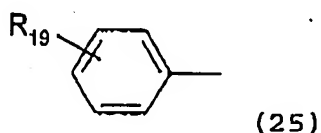


wherein  $q$  can be one or more integers within the range shown in the chemical formula, and  $\text{R}_{16}$  comprises a residue having either a phenyl structure or a thienyl structure, or  $\omega$ -cyclohexylalkanoic acid expressed by chemical formula (21) :

11



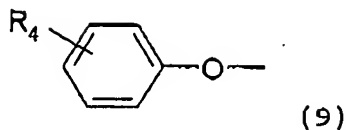
wherein  $\text{R}_{17}$  is selected from the group consisting of H, CN,  $\text{NO}_2$ , halogen,  $\text{CH}_3$ ,  $\text{C}_2\text{H}_5$ ,  $\text{C}_3\text{H}_7$ ,  $\text{CF}_3$ ,  $\text{C}_2\text{F}_5$  and  $\text{C}_3\text{F}_7$ , and  $r$  can be one or more integers within the range shown in the chemical formula as raw materials to biosynthesize the polyhydroxyalkanoate under a condition which comprise  $\omega$ -[(phenylmethyl)oxy]alkanoic acid expressed by chemical formula (19), and alkanoic acid expressed by chemical formula (20) or  $\omega$ -cyclohexylalkanoic acid expressed by chemical formula (21), wherein  $\text{R}_{16}$  in chemical formula (20) and  $\text{R}_{18}$  in chemical formula (22), i.e. residues having either a phenyl structure or a thienyl structure, are at least one group selected from the group consisting of residues



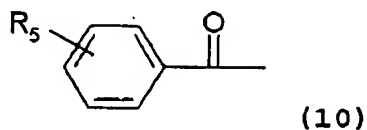
wherein  $\text{R}_{19}$  is selected from the group consisting of H, halogen, CN,  $\text{NO}_2$ ,  $\text{CH}_3$ ,  $\text{C}_2\text{H}_5$ ,  $\text{C}_3\text{H}_7$ ,  $\text{CH}=\text{CH}_2$ ,  $\text{CF}_3$ ,  $\text{C}_2\text{F}_5$  and  $\text{C}_3\text{F}_7$ , and in a case where there exist a plurality of units,  $\text{R}_{19}$  may be different for each unit;



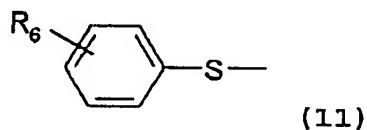
12



wherein  $R_4$  is selected from the group consisting of H, halogen, CN,  $\text{NO}_2$ ,  $\text{CH}_3$ ,  $\text{C}_2\text{H}_5$ ,  $\text{C}_3\text{H}_7$ ,  $\text{SCH}_3$ ,  $\text{CF}_3$ ,  $\text{C}_2\text{F}_5$  and  $\text{C}_3\text{F}_7$ , and in a case where there exist a plurality of units,  $R_4$  may be different for each unit;

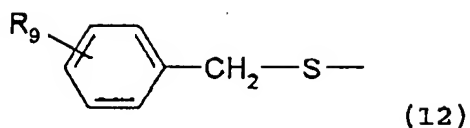


wherein  $R_5$  is selected from the group consisting of H, halogen, CN,  $\text{NO}_2$ ,  $\text{CH}_3$ ,  $\text{C}_2\text{H}_5$ ,  $\text{C}_3\text{H}_7$ ,  $\text{CF}_3$ ,  $\text{C}_2\text{F}_5$  and  $\text{C}_3\text{F}_7$ , and in a case where there exist a plurality of units,  $R_5$  may be different for each unit;

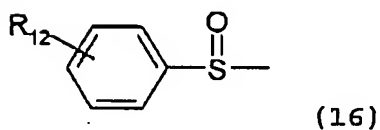
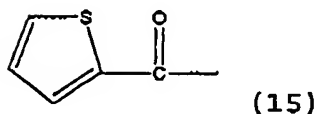
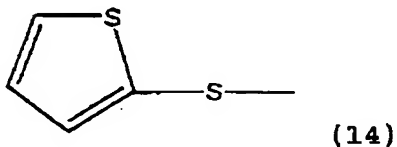
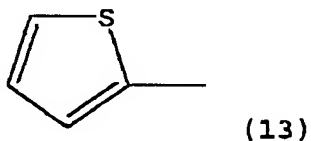


wherein  $R_6$  is selected from the group consisting of H, halogen, CN,  $\text{NO}_2$ ,  $\text{COOR}_7$ ,  $\text{SO}_2\text{R}_8$  (wherein  $R_7$  represents any one selected from the group consisting of H, Na, K,  $\text{CH}_3$  and  $\text{C}_2\text{H}_5$ , and  $R_8$  represents any one selected from the group consisting of OH, ONa, OK, halogen,  $\text{OCH}_3$  and  $\text{OC}_2\text{H}_5$ ),  $\text{CH}_3$ ,  $\text{C}_2\text{H}_5$ ,  $\text{C}_3\text{H}_7$ ,  $(\text{CH}_3)_2\text{-CH}$  and  $(\text{CH}_3)_3\text{-C}$ , and in a case where there exist a plurality of units,  $R_6$  may be different for each unit;

13



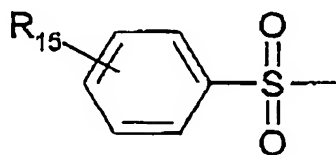
wherein  $R_9$  is selected from the group consisting of H, halogen, CN,  $\text{NO}_2$ ,  $\text{COOR}_{10}$ ,  $\text{SO}_2\text{R}_{11}$  (wherein  $\text{R}_{10}$  represents any one selected from the group consisting of H, Na, K,  $\text{CH}_3$  and  $\text{C}_2\text{H}_5$ , and  $\text{R}_{11}$  represents any one selected from the group consisting of OH, ONa, OK, halogen,  $\text{OCH}_3$  and  $\text{OC}_2\text{H}_5$ ),  $\text{CH}_3$ ,  $\text{C}_2\text{H}_5$ ,  $\text{C}_3\text{H}_7$ ,  $(\text{CH}_3)_2\text{-CH}$  and  $(\text{CH}_3)_3\text{-C}$ , and in a case where there exist a plurality of units,  $R_9$  may be different for each unit;



wherein  $\text{R}_{12}$  is selected from the group consisting of H,

14

halogen, CN, NO<sub>2</sub>, COOR<sub>13</sub>, SO<sub>2</sub>R<sub>14</sub> (wherein R<sub>13</sub> represents any one selected from the group consisting of H, Na, K, CH<sub>3</sub> and C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>, and R<sub>14</sub> represents any one selected from the group consisting of OH, ONa, OK, halogen, OCH<sub>3</sub> and OC<sub>2</sub>H<sub>5</sub>), CH<sub>3</sub>, C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>, C<sub>3</sub>H<sub>7</sub>, (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>-CH and (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>-C, and in a case where there exist a plurality of units, R<sub>12</sub> may be different for each unit; and



(17)

wherein R<sub>15</sub> is selected from the group consisting of H, halogen, CN, NO<sub>2</sub>, COOR<sub>16</sub>, SO<sub>2</sub>R<sub>17</sub> (wherein R<sub>16</sub> represents any one selected from the group consisting of H, Na, K, CH<sub>3</sub> and C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>, and R<sub>17</sub> represents any one selected from the group consisting of OH, ONa, OK, halogen, OCH<sub>3</sub> and OC<sub>2</sub>H<sub>5</sub>), CH<sub>3</sub>, C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>, C<sub>3</sub>H<sub>7</sub>, (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>-CH and (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>-C, and in a case where there exist a plurality of units, R<sub>15</sub> may be different for each unit.

9. The method for producing a polyhydroxyalkanoate according to any one of claims 5 to 8, wherein said condition is that said microorganisms is cultured in a medium containing ω-[(phenylmethyl)oxy]alkanoic acid expressed by chemical formula (19).

10. The method for producing a polyhydroxyalkanoate

according to claim 8, wherein said condition is that said microorganism is cultured in a medium containing the  $\omega$ -[(phenylmethyl)oxylalkanoic acid expressed by chemical formula (19) and the alkanoic acid expressed  
5 by chemical formula (20) or the  $\omega$ -cyclohexylalkanoic acid expressed by chemical formula (21).

11. The method for producing a polyhydroxyalkanoate according to claim 9 or 10, wherein said medium  
10 contains at least one selected from the group consisting of peptides, yeast extract, organic acids or salts thereof, amino acids or salts thereof, saccharides and straight-chain alkanoic acids, which is saturated or unsaturated fatty acid having 4 to 12  
15 carbon atoms or salts thereof.

12. The method for producing a polyhydroxyalkanoate according to claim 11, wherein the peptide is polypeptone; the organic acids or salts thereof are  
20 one or more compounds selected from the group consisting of pyruvic acid, oxaloacetic acid, citric acid, isocitric acid, ketoglutaric acid, succinic acid, fumaric acid, malic acid, lactic acid, and salts thereof; the amino acids or salts thereof are  
25 one or more compounds selected from the group consisting of glutamic acid, aspartic acid, and salts thereof; and the saccharides are one or more

16

compounds selected from the group consisting of glycerolaldehyde, erythrose, arabinose, xylose, glucose, galactose, mannose, fructose, glycerol, erythritol, xylitol, gluconic acid, glucuronic acid  
5 and galacturonic acid, maltose, sucrose and lactose.

13. The method for producing a polyhydroxyalkanoate according to any one of claims 9 to 12, wherein said culture of microorganisms comprises two or more  
10 culturing steps.

14. The method for producing a polyhydroxyalkanoate according to claim 13, wherein said culture is a fed-batch culture.  
15

15. The method for producing a polyhydroxyalkanoate according to any one of claims 9 to 14, comprising a step of recovering a polyhydroxyalkanoate comprising  
3-hydroxy- $\omega$ -[(phenylmethyl)oxy]alkanoic acid unit  
20 expressed by chemical formula (1) generated by the microorganism from the cells of the microorganism.

16. The method for producing a polyhydroxyalkanoate according to any one of claims 5 to 15, wherein said  
25 microorganism belongs to *Pseudomonas* species.

17. The method for producing a polyhydroxyalkanoate

17

according to claim 16, wherein said microorganism is  
one or more strains selected from the group  
consisting of *Pseudomonas cichorii* YN2 (FERM BP-7375),  
*Pseudomonas cichorii* H45 (FERM BP-7374) and  
5 *Pseudomonas jessenii* P161 (FERM BP-7376).

JP 3880566 B2 2007.2.14

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第3880566号

(P3880566)

(45) 発行日 平成19年2月14日(2007.2.14)

(24) 登録日 平成18年11月17日(2006.11.17)

(51) Int. Cl.

F I

C08G 83/08 (2006.01)

C08G 83/06 ZBP

C12P 7/62 (2006.01)

C12P 7/62

C08L 101/16 (2006.01)

C08L 101/16

C12R 1/38 (2006.01)

C12P 7/62

C12R 1:38

請求項の数 17 (全 56 頁)

(21) 出願番号 特願2003-356749 (P2003-356749)  
 (22) 出願日 平成15年10月16日(2003.10.16)  
 (65) 公開番号 特開2004-162045 (P2004-162045A)  
 (43) 公開日 平成16年6月10日(2004.6.10)  
 審判請求日 平成15年11月28日(2003.11.28)  
 (31) 優先権主張番号 特願2002-309786 (P2002-309786)  
 (32) 優先日 平成14年10月24日(2002.10.24)  
 (33) 優先権主張国 日本国(JP)

(73) 特許権者 000001007

キヤノン株式会社

東京都大田区下丸子3丁目30番2号

(74) 代理人 100123788

弁理士 宮崎 昭夫

(74) 代理人 100088328

弁理士 金田 暢之

(74) 代理人 100106297

弁理士 伊藤 克博

(74) 代理人 100106138

弁理士 石橋 政幸

(72) 発明者 見目 敬

東京都大田区下丸子3丁目30番2号 キヤノン株式会社内

最終頁に続く

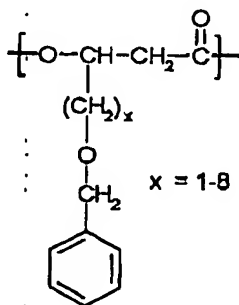
(54) 【発明の名称】 側鎖に(フェニルメチル)オキシ構造を有するユニットを含む新規なポリヒドロキシアлкаノエート及びその製造方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

化学式(1)に示す3-ヒドロキシ-ω-[(フェニルメチル)オキシ]アルカン酸のモノマーユニットを含むことを特徴とするポリヒドロキシアлкаノエート。

【化1】



(1)

(xは化学式中に示した範囲内で任意の一つ以上の整数値を取り得る)

【請求項2】

前記化学式(1)に示すモノマーユニット以外に、化学式(2)及び(3)に示すユニットの少なくとも一つを含む、請求項1記載のポリヒドロキシアлкаノエート。

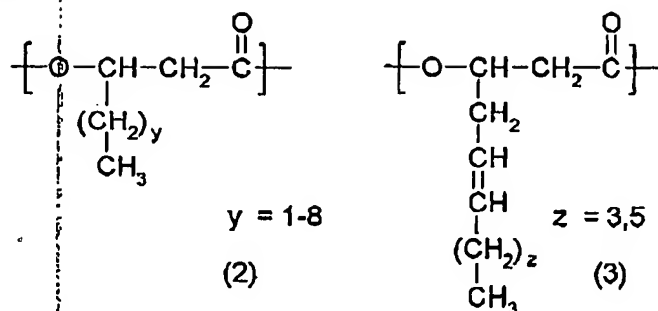
10

20

(2)

JP 3880566 B2 2007.2.14

【化2】



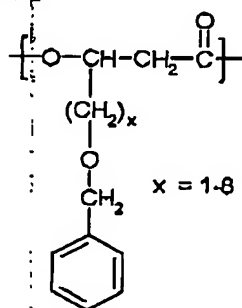
10

( $y$  及び  $z$  は化学式 (1) で示すユニットと独立して化学式中に示した範囲内で任意の一つ以上の整数値をとり得る。)

【請求項3】

前記化学式 (1) :

【化5】



(1)

20

( $x$  は化学式中に示した範囲内で任意の一つ以上の整数値をとり得る)

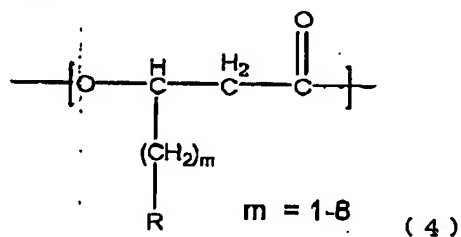
に示す3-ヒドロキシ- $\omega$ -[(フェニルメチル)オキシ]アルカン酸ユニットのモノマ

30

二と、

化学式 (4) :

【化6】



40

( $m$  は化学式中に示した範囲内で任意の一つ以上の整数値をとり得る；R はフェニル構造或いはチエニル構造のいずれかの構造を有する残基を含んでいる)

で示すユニット、

もしくは

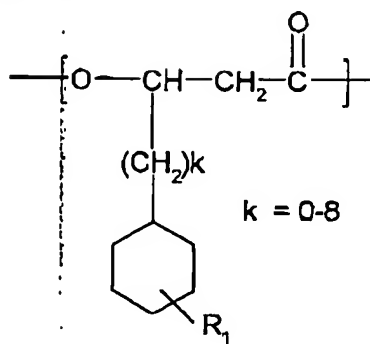
化学式 (5) :



(3)

JP 3880566 B2 2007.2.14

【化7】



10

(式中、 $R_1$ はシクロヘキシル基への置換基を示し、 $R_1$ はH原子、CN基、 $NO_2$ 基、ハロゲン原子、 $CH_3$ 基、 $C_2H_5$ 基、 $C_3H_7$ 基、 $CF_3$ 基、 $C_2F_5$ 基または $C_3F_7$ 基であり、 $k$ は化学式中に示した範囲内で任意の一つ以上の整数値をとり得る)

に示す3-ヒドロキシ- $\omega$ -シクロヘキシルアルカン酸ユニットと

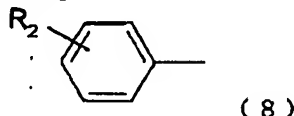
を少なくとも分子中に同時に含むポリヒドロキシアリカノエートであって、

前記化学式(4)におけるR、即ちフェニル構造或いはチエニル構造のいずれかの構造を有する残基が、

化学式(8)：

20

【化3.3】



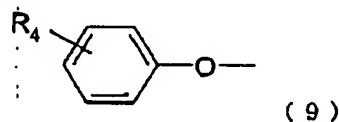
(式中、 $R_2$ は芳香環への置換基を示し、 $R_2$ はH原子、ハロゲン原子、CN基、 $NO_2$ 基、 $CH_3$ 基、 $C_2H_5$ 基、 $C_3H_7$ 基、 $CH=CH_2$ 基、 $COOR_3$  ( $R_3$ : H原子、Na原子、K原子のいずれかを表す)、 $CF_3$ 基、 $C_2F_5$ 基または $C_3F_7$ 基であり、複数のユニットが存在する場合、 $R_2$ は、ユニット毎に異なってもよい。)

で示される残基群、

30

化学式(9)：

【化3.4】



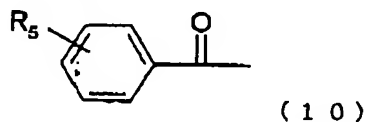
(式中、 $R_4$ は芳香環への置換基を示し、 $R_4$ はH原子、ハロゲン原子、CN基、 $NO_2$ 基、 $CH_3$ 基、 $C_2H_5$ 基、 $C_3H_7$ 基、 $SCH_3$ 基、 $CF_3$ 基、 $C_2F_5$ 基または $C_3F_7$ 基であり、複数のユニットが存在する場合、 $R_4$ は、異なってもよい。)

40

で示される残基群、

化学式(10)：

【化3.5】



(式中、 $R_5$ は芳香環への置換基を示し、 $R_5$ はH原子、ハロゲン原子、CN基、 $NO_2$ 基

50

(4)

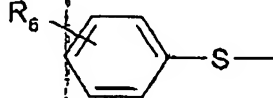
JP 3880566 B2 2007.2.14

、 $\text{CH}_3$ 基、 $\text{C}_2\text{H}_5$ 基、 $\text{C}_3\text{H}_7$ 基、 $\text{CF}_3$ 基、 $\text{C}_2\text{F}_5$ 基または $\text{C}_3\text{F}_7$ 基であり、複数のユニットが存在する場合、 $\text{R}_6$ は、ユニット毎に異なってもよい。)

で示される残基群、

化学式(11)：

【化36】



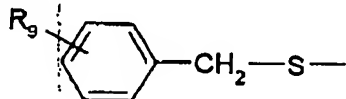
(11)

(式中、 $\text{R}_6$ は芳香環への置換基を示し、 $\text{R}_6$ はH原子、ハロゲン原子、CN基、 $\text{NO}_2$ 基、 $\text{COOR}_7$ 、 $\text{SO}_2\text{R}_8$  ( $\text{R}_7$ : H、Na、K、 $\text{CH}_3$ 、 $\text{C}_2\text{H}_5$ のいずれかを表し、 $\text{R}_8$ : OH、ONa、OK、ハロゲン原子、 $\text{OCH}_3$ 、 $\text{OC}_2\text{H}_5$ のいずれかを表す)、 $\text{CH}_3$ 基、 $\text{C}_2\text{H}_5$ 基、 $\text{C}_3\text{H}_7$ 基、 $(\text{CH}_3)_2\text{-CH}$ 基または $(\text{CH}_3)_3\text{-C}$ 基であり、複数のユニットが存在する場合、 $\text{R}_6$ は、ユニット毎に異なってもよい。)

で示される残基群、

化学式(12)：

【化37】



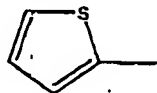
(12)

(式中、 $\text{R}_6$ は芳香環への置換基を示し、 $\text{R}_6$ はH原子、ハロゲン原子、CN基、 $\text{NO}_2$ 基、 $\text{COOR}_{10}$ 、 $\text{SO}_2\text{R}_{11}$  ( $\text{R}_{10}$ : H、Na、K、 $\text{CH}_3$ 、 $\text{C}_2\text{H}_5$ のいずれかを表し、 $\text{R}_{11}$ : OH、ONa、OK、ハロゲン原子、 $\text{OCH}_3$ 、 $\text{OC}_2\text{H}_5$ のいずれかを表す)、 $\text{CH}_3$ 基、 $\text{C}_2\text{H}_5$ 基、 $\text{C}_3\text{H}_7$ 基、 $(\text{CH}_3)_2\text{-CH}$ 基または $(\text{CH}_3)_3\text{-C}$ 基であり、複数のユニットが存在する場合、 $\text{R}_6$ は、ユニット毎に異なってもよい。)

で示される残基群、

化学式(13)：

【化38】

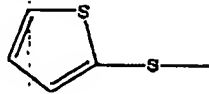


(13)

で示される残基、

化学式(14)：

【化39】



(14)

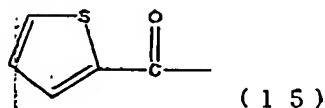
で示される残基、

化学式(15)：

(5)

JP 3880566 B2 2007.2.14

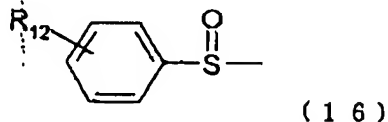
【化 40】



で示される残基、

化学式 (16) :

【化 41】



10

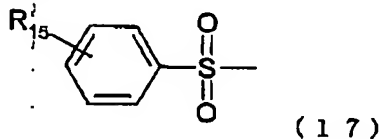
(式中、 $R_{12}$ は芳香環への置換基を示し、 $R_{12}$ はH原子、ハロゲン原子、CN基、 $NO_2$ 基、 $COOR_{13}$ 、 $SO_2R_{14}$  ( $R_{13}$ : H、Na、K、 $CH_3$ 、 $C_2H_5$ のいずれかを表し、 $R_{14}$ : OH、ONa、OK、ハロゲン原子、 $OCH_3$ 、 $OC_2H_5$ のいずれかを表す)、 $CH_3$ 基、 $C_2H_5$ 基、 $C_3H_7$ 基、 $(CH_2)_2-CH$ 基または $(CH_2)_3-C$ 基であり、複数のユニットが存在する場合、 $R_{12}$ は、ユニット毎に異なってもよい。)

で示される残基群、及び

化学式 (17) :

20

【化 42】



(式中、 $R_{15}$ は芳香環への置換基を示し、 $R_{15}$ はH原子、ハロゲン原子、CN基、 $NO_2$ 基、 $COOR_{16}$ 、 $SO_2R_{17}$  ( $R_{16}$ : H、Na、K、 $CH_3$ 、 $C_2H_5$ のいずれかを表し、 $R_{17}$ : OH、ONa、OK、ハロゲン原子、 $OCH_3$ 、 $OC_2H_5$ のいずれかを表す)、 $CH_3$ 基、 $C_2H_5$ 基、 $C_3H_7$ 基、 $(CH_2)_2-CH$ 基または $(CH_2)_3-C$ 基であり、複数のユニットが存在する場合、 $R_{15}$ は、ユニット毎に異なってもよい。)

30

で示される残基群

からなる群より選択される1つ以上の残基である、請求項1又は2に記載のポリヒドロキシアルカノエート。

【請求項4】

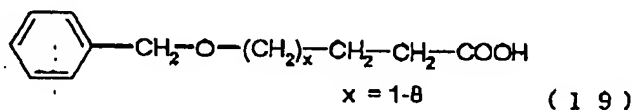
数平均分子量が1000から1000000の範囲である請求項1乃至3のいずれかに記載のポリヒドロキシアルカノエート。

【請求項5】

化学式 (19) :

40

【化 18】



( $x$ は化学式中に示した範囲内で任意の一つ以上の整数値をとり得る)

で示す $\omega$ -[(フェニルメチル)オキシ]アルカン酸を含む条件下で、

前記化学式 (19) で示す $\omega$ -[(フェニルメチル)オキシ]アルカン酸を原料として、

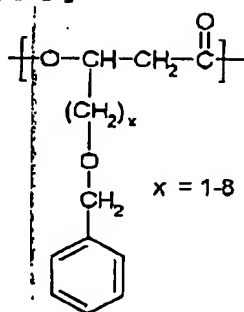
化学式 (1) :

50

(6)

JP 3880566 B2 2007.2.14

【化 19】



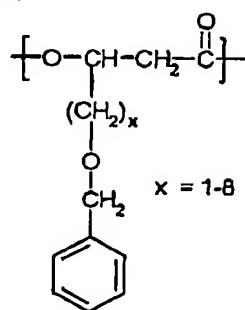
(1)

10

(x は化学式中に示した範囲内で任意の一つ以上の整数値をとり得る)  
 で示すβ-ヒドロキシ-ω-[(フェニルメチル)オキシ]アルカン酸のモノマーユニットを分子中に含むポリヒドロキシアлкаノエートを生成する能力を有する微生物により合成せしめることを特徴とする、

前記化学式(1)：

【化 20】



(1)

20

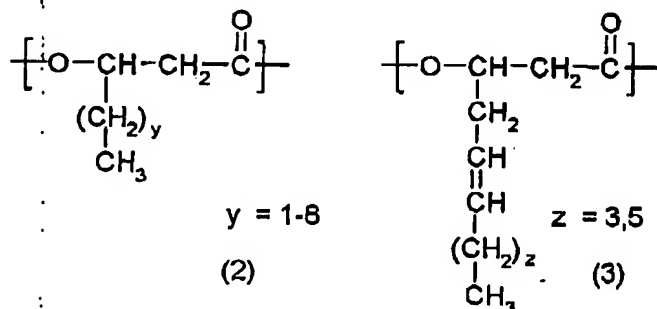
(x は化学式中に示した範囲内で任意の一つ以上の整数値をとり得る)  
 で示すβ-ヒドロキシ-ω-[(フェニルメチル)オキシ]アルカン酸のモノマーユニットを分子中に含むポリヒドロキシアлкаノエートの製造方法。

30

【請求項 6】

前記化学式(1)で示されるモノマーユニットに加えて、下記化学式(2)及び(3)に示されるユニットの少なくとも一つを含む、請求項5記載のポリヒドロキシアлкаノエートの製造方法。

【化 21】



40

(y 及び z は化学式(1)で示すユニットと独立して化学式中に示した範囲内で任意の一つ以上の整数値をとり得る。)

【請求項 7】

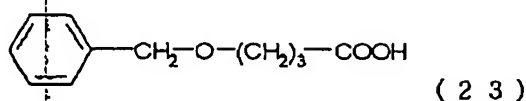
50

(7)

JP 3880566 B2 2007.2.14

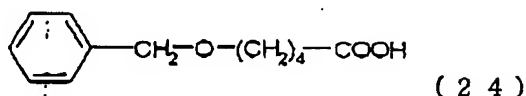
前記化学式(19)に示す $\omega$ -[(フェニルメチル)オキシ]アルカン酸が、  
化学式(23)：

【化22】



に示す4-[(フェニルメチル)オキシ]酪酸、及び  
化学式(24)：

【化23】

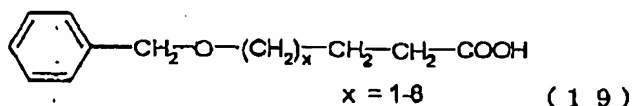


に示す5-[(フェニルメチル)オキシ]吉草酸  
のうちのいずれか1つ以上である請求項5又は6に記載のポリヒドロキシアルカノエートの製造方法。

【請求項8】

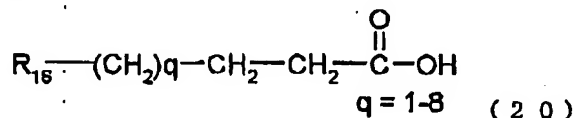
前記化学式(19)：

【化24】



(xは化学式中に示した範囲内で任意の一つ以上の整数値をとり得る)  
で示す $\omega$ -[(フェニルメチル)オキシ]アルカン酸と、  
化学式(20)：

【化25】



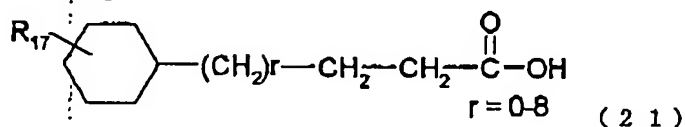
(qは化学式中に示した範囲内で任意の一つ以上の整数値をとり得る；R<sub>16</sub>はフェニル構造、或いはチエニル構造のいずれかの構造を有する残基を含んでいる)

で示す化合物、

もしくは

化学式(21)：

【化26】



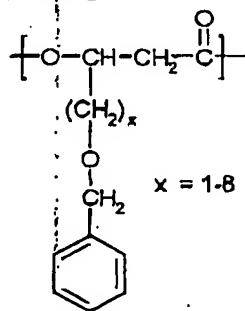
(式中、R<sub>17</sub>はシクロヘキシル基への置換基を示し、R<sub>17</sub>はH原子、CN基、NO<sub>2</sub>基、ハロゲン原子、C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>基、C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>基、C<sub>3</sub>H<sub>7</sub>基、CF<sub>3</sub>基、C<sub>2</sub>F<sub>5</sub>基またはC<sub>3</sub>F<sub>7</sub>基であり、また、rは化学式中に示した範囲内で任意の一つ以上の整数値をとり得る)

(8)

JP 3880566 B2 2007.2.14

で示す $\omega$ -シクロヘキシルアルカン酸と  
を含む条件下で、前記化学式(19)で示す $\omega$ -[(フェニルメチル)オキシ]アルカン  
酸、及び前記化学式(20)で示す化合物もしくは前記化学式(21)で示す $\omega$ -シクロ  
ヘキシルアルカン酸を原料として、  
前記化学式(1)：

【化27】



(1)

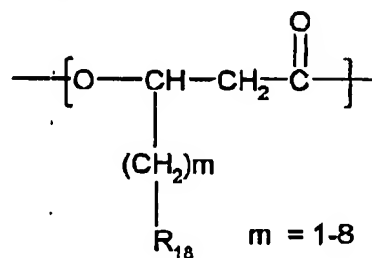
10

( $x$ は化学式中に示した範囲内で任意の一つ以上の整数値をとり得る)  
で示す3-ヒドロキシ $\omega$ -[(フェニルメチル)オキシ]アルカン酸のモノマーユニッ  
トと、

20

化学式(22)：

【化28】



(22)

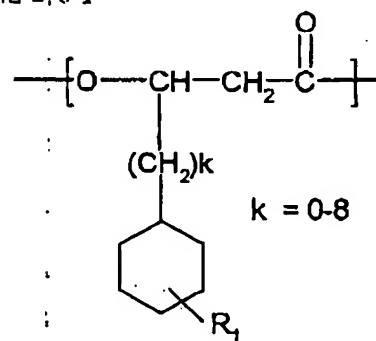
30

( $m$ は化学式中に示した範囲内で任意の一つ以上の整数値をとり得る； $\text{R}_{18}$ はフェニル構  
造或いはチエニル構造のいずれかの構造を有する残基を含んでいる)  
で示すユニット

もしくは

化学式(5)：

【化29】



(5)

40

(式中、 $\text{R}_1$ はシクロヘキシル基への置換基を示し、 $\text{R}_1$ はH原子、CN基、 $\text{NO}_2$ 基、ハ  
ロゲン原子、 $\text{CH}_3$ 基、 $\text{C}_2\text{H}_5$ 基、 $\text{C}_3\text{H}_7$ 基、 $\text{CF}_3$ 基、 $\text{C}_2\text{F}_5$ 基または $\text{C}_3\text{F}_7$ 基であり、

50

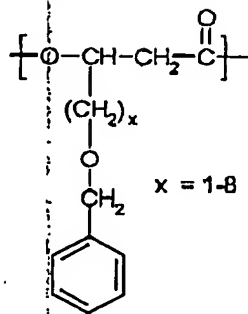
(9)

JP 3880566 B2 2007.2.14

また、 $k$ は化学式中に示した範囲内で任意の一つ以上の整数値をとり得る)  
 に示す3-ヒドロキシ- $\omega$ -シクロヘキシルアルカン酸ユニットと  
 を少なくとも分子中に同時に含むポリヒドロキシアルカノエートを生産する能力を有する  
 微生物により生合成せしめることを特徴とする、

前記化学式(1)：

【化30】



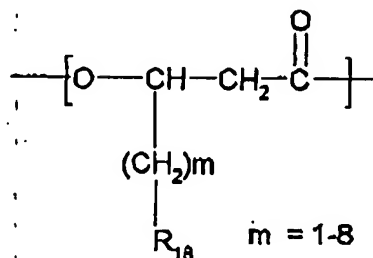
(1)

10

( $x$ は化学式中に示した範囲内で任意の一つ以上の整数値をとり得る)  
 で示す3-ヒドロキシ- $\omega$ -[(フェニルメチル)オキシ]アルカン酸のモノマーユニットと、

前記化学式(22)：

【化31】



(22)

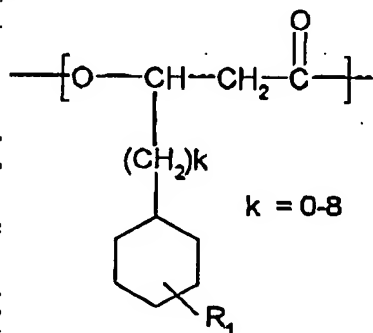
30

( $m$ は化学式中に示した範囲内で任意の一つ以上の整数値をとり得る； $R_{18}$ はフェニル構造  
 或いはチエニル構造のいずれかの構造を有する残基を含んでいる)  
 で示すユニット

もしくは

前記化学式(5)：

【化32】



(5)

40

(式中、 $R_1$ はシクロヘキシル基への置換基を示し、 $R_1$ はH原子、CN基、 $NO_2$ 基、ハ  
 ロゲン原子、 $CH_3$ 基、 $C_2H_5$ 基、 $C_3H_7$ 基、 $CF_3$ 基、 $C_2F_5$ 基または $C_3F_7$ 基であり、

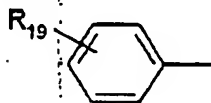
50

(10)

JP 3880566 B2 2007.2.14

また、 $k$ は化学式中に示した範囲内で任意の一つ以上の整数値をとり得る)  
に示す3-ヒドロキシ- $\omega$ -シクロヘキシルアルカン酸ユニットと  
を少なくとも分子中に同時に含むポリヒドロキシアлкаノエートの製造方法であって、  
前記化学式(20)における $R_{19}$ 及び前記化学式(22)における $R_{19}$ 、即ちフェニル構造  
或いはチエニル構造のいずれかの構造を有する残基が、  
化学式(25)：

【化4.3】



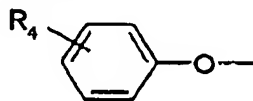
(25)

10

(式中、 $R_{19}$ は芳香環への置換基を示し、 $R_{19}$ はH原子、ハロゲン原子、CN基、 $NO_2$ 基、 $CH_3$ 基、 $C_2H_5$ 基、 $C_3H_7$ 基、 $CH=CH_2$ 基、 $CF_3$ 基、 $C_2F_5$ 基または $C_4F_7$ 基であり、複数のユニットが存在する場合、 $R_{19}$ は、ユニット毎に異なってもよい。)  
で示される残基群、

化学式(9)：

【化4.4】



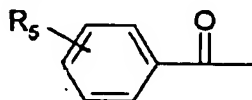
(9)

20

(式中、 $R_4$ は芳香環への置換基を示し、 $R_4$ はH原子、ハロゲン原子、CN基、 $NO_2$ 基、 $CH_3$ 基、 $C_2H_5$ 基、 $C_3H_7$ 基、 $SCH_3$ 基、 $CF_3$ 基、 $C_2F_5$ 基または $C_4F_7$ 基であり、複数のユニットが存在する場合、 $R_4$ は、ユニット毎に異なってもよい。)  
で示される残基群、

化学式(10)：

【化4.5】



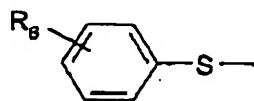
(10)

30

(式中、 $R_5$ は芳香環への置換基を示し、 $R_5$ はH原子、ハロゲン原子、CN基、 $NO_2$ 基、 $CH_3$ 基、 $C_2H_5$ 基、 $C_3H_7$ 基、 $CF_3$ 基、 $C_2F_5$ 基または $C_4F_7$ 基であり、複数のユニットが存在する場合、 $R_5$ は、ユニット毎に異なってもよい。)  
で示される残基群、

化学式(11)：

【化4.6】



(11)

40

(式中、 $R_6$ は芳香環への置換基を示し、 $R_6$ はH原子、ハロゲン原子、CN基、 $NO_2$ 基、 $COOR_7$ 、 $SO_2R_8$  ( $R_7$ : H、Na、K、 $CH_3$ 、 $C_2H_5$ のいずれかを表し、 $R_8$ : O、H、ONa、OK、ハロゲン原子、 $OCH_3$ 、 $OC_2H_5$ のいずれかを表す)、 $CH_3$ 基、 $C_2H_5$ 基、 $C_3H_7$ 基、 $(CH_3)_2CH$ 基または $(CH_3)_3C$ 基であり、複数のユニットが存在する場合、 $R_6$ は、ユニット毎に異なってもよい。)

50

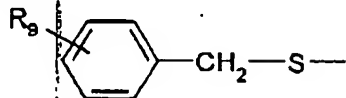


(11)

JP 3880566 B2 2007.2.14

で示される残基群、化学式(12) :

【化47】



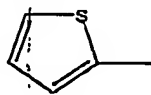
(12)

(式中、 $R_9$ は芳香環への置換基を示し、 $R_9$ はH原子、ハロゲン原子、CN基、 $NO_2$ 基、 $COOR_{11}$ 、 $SO_2R_{11}$  ( $R_{11}$ : H、Na、K、 $CH_3$ 、 $C_2H_5$ のいずれかを表し、 $R_{11}$ : OH、ONa、OK、ハロゲン原子、 $OCH_3$ 、 $OC_2H_5$ のいずれかを表す)、 $CH_3$ 基、 $C_2H_5$ 基、 $C_3H_7$ 基、 $(CH_2)_2-CH$ 基または $(CH_2)_3-C$ 基であり、複数のユニットが存在する場合、 $R_9$ は、ユニット毎に異なってもよい。)

10

で示される残基群、化学式(13) :

【化48】

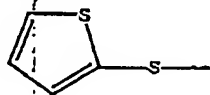


(13)

20

で示される残基、化学式(14) :

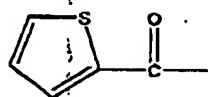
【化49】



(14)

で示される残基、化学式(15) :

【化50】

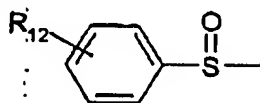


(15)

30

で示される残基、化学式(16) :

【化51】



(16)

40

(式中、 $R_{12}$ は芳香環への置換基を示し、 $R_{12}$ はH原子、ハロゲン原子、CN基、 $NO_2$ 基、 $COOR_{13}$ 、 $SO_2R_{13}$  ( $R_{13}$ : H、Na、K、 $CH_3$ 、 $C_2H_5$ のいずれかを表し、 $R_{13}$ : OH、ONa、OK、ハロゲン原子、 $OCH_3$ 、 $OC_2H_5$ のいずれかを表す)、 $CH_3$ 基、 $C_2H_5$ 基、 $C_3H_7$ 基、 $(CH_2)_2-CH$ 基または $(CH_2)_3-C$ 基であり、複数のユニットが存在する場合、 $R_{12}$ は、ユニット毎に異なってもよい。)

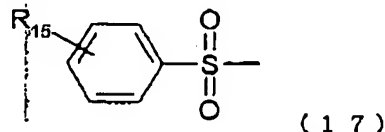
50

(12)

JP 3880566 B2 2007.2.14

で示される残基群、及び  
化学式(17)：

【化512】



(式中、 $R_{15}$ は芳香環への置換基を示し、 $R_{16}$ はH原子、ハロゲン原子、CN基、 $NO_2$ 基、 $C(O)OR_{16}$ 、 $SO_2R_{17}$  ( $R_{16}$ : H、Na、K、 $CH_3$ 、 $C_2H_5$ のいずれかを表し、 $R_{17}$ : OH、ONa、OK、ハロゲン原子、 $OCH_3$ 、 $OC_2H_5$ のいずれかを表す)、 $CH_3$ 基、 $C_2H_5$ 基、 $C_3H_7$ 基、 $(CH_3)_2-CH$ 基または $(CH_3)_3-C$ 基であり、複数のユニットが存在する場合、 $R_{15}$ は、ユニット毎に異なってもよい。)

で示される残基群

からなる群より選択される1つ以上の残基である、請求項5乃至7のいずれかに記載のポリヒドロキシアルカノエートの製造方法。

【請求項9】

前記化学式(19)で示す $\omega$ -[(フェニルメチル)オキシ]アルカン酸を含む培地中で前記微生物を培養することを特徴とする、請求項5乃至8のいずれかに記載のポリヒドロキシアルカノエートの製造方法。

【請求項10】

前記化学式(19)で示す $\omega$ -[(フェニルメチル)オキシ]アルカン酸と、前記化学式(20)で示す化合物もしくは前記化学式(21)で示す $\omega$ -シクロヘキシルアルカン酸とを含む培地中で前記微生物を培養することを特徴とする、請求項8に記載のポリヒドロキシアルカノエートの製造方法。

【請求項11】

前記微生物の培養が、前記化学式(19)で示す $\omega$ -[(フェニルメチル)オキシ]アルカン酸に加えて、ペプチド類、酵母エキス、有機酸及びその塩、アミノ酸及びその塩、糖類、並びに、炭素数4から12の直鎖アルカン酸及びその塩からなる群より選択される少なくとも1種類を含む培地中で、前記微生物を培養することを特徴とする請求項9または10に記載のポリヒドロキシアルカノエートの製造方法。

【請求項12】

前記微生物の培養において、培地中に含有されるペプチド類がポリペプトンであり、また、培地中に含有される有機酸或いはその塩が、ピルビン酸、オキサロ酢酸、クエン酸、イソクエン酸、ケトグルタル酸、コハク酸、フマル酸、リンゴ酸、乳酸、及びこれらの塩からなる群より選択される1つ以上の化合物であり、また、培地中に含有されるアミノ酸或いはその塩が、グルタミン酸、アシパラギン酸、及びこれらの塩からなる群より選択される1つ以上の化合物であり、また、培地中に含有される糖類が、グリセロアルデヒド、エリトロース、アラビノース、キシロース、グルコース、ガラクトース、マンノース、フルクトース、グリセロール、エリトリール、キシリトリール、グルコン酸、グルクロン酸、ガラクツロン酸、マルトース、スクロース、及びラクトースからなる群より選択される1つ以上の化合物であることを特徴とする請求項11に記載のポリヒドロキシアルカノエートの製造方法。

【請求項13】

前記微生物の培養が、二段階以上の培養工程を含むことを特徴とする請求項9乃至12のいずれかに記載のポリヒドロキシアルカノエートの製造方法。

【請求項14】

前記二段階以上の培養工程を含む微生物の培養が、フェド・バッチ培養であることを特徴とする請求項13に記載のポリヒドロキシアルカノエートの製造方法。

【請求項15】

(13)

JP 3880566 B2 2007.2.14

前記化学式(19)で示すω-[(フェニルメチル)オキシ]アルカン酸を含む培地で前記微生物を培養し、前記微生物が産生した前記化学式(1)で示す3-ヒドロキシω-[(フェニルメチル)オキシ]アルカン酸ユニットを少なくとも含むポリヒドロキシアルカノエートを微生物細胞から回収する工程を有することを特徴とする請求項9乃至14のいずれかに記載のポリヒドロキシアルカノエートの製造方法。

【請求項16】

前記微生物として、シュードモナス(*Pseudomonas*)属に属する微生物を用いることを特徴とする請求項5乃至15のいずれかに記載のポリヒドロキシアルカノエートの製造方法。

【請求項17】

前記微生物として、シュードモナス・チコリアイ YN2株(*Pseudomonas cicchorii* YN2; FERMBP-7375)、シュードモナス・チコリアイ H45株(*Pseudomonas cicchorii* H45; FERMBP-7374)、及びシュードモナス・ジェッセニイ P161株(*Pseudomonas jessenii* P161; FERMBP-7376)のいずれか1つ以上の株を用いることを特徴とする請求項16記載のポリヒドロキシアルカノエートの製造方法。

【発明の詳細な説明】

【発明の属する技術分野】

【0001】

本発明は、新規なユニットを含むポリヒドロキシアルカノエートと、微生物を利用するその製造方法に関する。

【背景技術】

【0002】

これまで、多くの微生物が、ポリ-3-ヒドロキシ酪酸(PHB)あるいはその他のポリヒドロキシアルカノエート(PHA)を生産し、その菌体内に蓄積することが報告されている。これらポリヒドロキシアルカノエートなどの微生物が産生するポリマーは、従来のプラスチックと同様に、溶融加工等により各種製品の生産に利用することができる。さらに、微生物が産生するポリマー、例えば、ポリヒドロキシアルカノエートなどは、生分解性を有しており、自然界の微生物により完全分解されるという利点を有している。従って、例えば、微生物が産生するポリヒドロキシアルカノエートは、廃棄した際、従来の多くの合成高分子化合物のように自然環境にそのまま残留し、汚染を引き起こす要因となることがない。また、微生物が産生するポリヒドロキシアルカノエートは、一般に生体適合性にも優れており、医療用軟質部材等としての応用も期待されている。

【0003】

この微生物産生ポリヒドロキシアルカノエートは、その生産に用いる微生物の種類、ならびに、培地組成、培養条件等により、様々な組成や構造のものとなり得ることも知られている。これまで、主にポリヒドロキシアルカノエートの物性の改良という観点から、微生物産生ポリヒドロキシアルカノエートの組成や構造の制御を試みる研究がなされてきた。

【0004】

微生物産生ポリヒドロキシアルカノエートの組成や構造の制御を目的とする研究の一つとして、近年、ユニット中に芳香環を有するポリヒドロキシアルカノエートを微生物に生産させる研究が盛んになされている。

【0005】

(a) フェニル基もしくはその部分置換体を含むもの

・5-フェニル吉草酸を基質として、シュードモナスオレオボランス(*Pseudomonas oleovorans*)が3-ヒドロキシ-5-フェニル吉草酸をユニットとして含むポリヒドロキシアルカノエートを生産することが報告されている(Makromol. Chem., 191号、1990年、p. 1957-1965(非特許文献1)、Macromolecules, 24号、1991年、p. 5256-5260(非特許文献

(14)

JP 3880566 B2 2007.2.14

2))

・5-(p-トリル)吉草酸を基質として、シュードモナスオレオボランスが3-ヒドロキシ-5-(p-トリル)吉草酸ユニットを含むポリヒドロキシアリカノエートを生産することが報告されている(Macromolecules, 29号、1996年、p. 1762-1766(非特許文献3))。

・5-(2,4-ジニトロフェニル)吉草酸を基質として、シュードモナスオレオボランスが3-ヒドロキシ-5-(2,4-ジニトロフェニル)吉草酸ユニット及び3-ヒドロキシ-5-(p-ニトロフェニル)吉草酸ユニットを含むポリヒドロキシアリカノエートを生産することが報告されている(Macromolecules, 32号、1999年、p. 2889-2895(非特許文献4))。

【0006】

(b).フェノキシ基もしくはその部分置換体を含むもの

・11-フェノキシウンデカン酸を基質として、シュードモナスオレオボランスが3-ヒドロキシ-5-フェノキシ吉草酸ユニットと3-ヒドロキシ-9-フェノキシノナン酸ユニットを含むポリヒドロキシアリカノエート共重合体を生産することが報告されている(Macromol. Chem. Phys., 195号、1994年、p. 1665-1672(非特許文献5))。

【0007】

3-ヒドロキシ-5-(モノフルオロフェノキシ)ペンタノエート(3H5(MFP)P)ユニット、あるいは3-ヒドロキシ-5-(ジフルオロフェノキシ)ペンタノエート(3H5(DFP)P)ユニットからなる単独重合体；少なくとも、3H5(MFP)Pユニットあるいは3H5(DFP)Pユニットを含有する共重合体；これらのポリマーの産生能力を有するシュードモナス・プチダ；シュードモナス属を用いた、前記のポリマーの製造法に関する発明が開示されている。加えて、その発明の効果として、置換基を有する長鎖脂肪酸を資化して、側鎖末端に、1から2個のフッ素原子が置換したフェノキシ基をもつポリマーを合成することができ、また、かかるポリマーは、融点が高い上、良い加工性を保持しつつ、加えて、立体規則性、撥水性を与えることができる点を記載している。(特許第2989175号公報(特許文献1))。

【0008】

このユニット中の芳香環上にフッ素置換を有するフッ素置換PHA以外に、ユニット中の芳香環上にシアノ基やニトロ基が置換したポリヒドロキシアリカノエートの研究もなされている。

【0009】

シュードモナスオレオボランスATCC29347株及びシュードモナスプチダ(Pseudomonas putida)KT2442株を用いて、オクタン酸と6-(p-シアノフェノキシ)ヘキサン酸あるいは6-(p-ニトロフェノキシ)ヘキサン酸を基質として、3-ヒドロキシ-6-(p-シアノフェノキシ)ヘキサン酸あるいは3-ヒドロキシ-6-(p-ニトロフェノキシ)ヘキサン酸をモノマーユニットとして含むポリヒドロキシアリカノエートの生産が報告されている(Can. J. Microbiol., 41号、1995年、p. 32-43(非特許文献6)、Polymer International, 39号、1996年、p. 205-213(非特許文献7))。

【0010】

これら環上に置換基を持つ芳香環を有するユニットを含むポリヒドロキシアリカノエートは、ガラス転移温度が高く、加工性も良いという、芳香環に由来するポリマー性状を維持しつつ、芳香環上に存在している置換基に由来する新たな機能も付与された、多機能のポリヒドロキシアリカノエートとなる。

【0011】

また、その一方で、ユニット中にプロモ基を有するポリヒドロキシアリカノエートを基に、生産ポリマーに対して、前記プロモ基を利用する化学変換により任意の官能基をポリマー側鎖に導入し、多機能のポリヒドロキシアリカノエートを得ることを目的とした研究

(15)

JP 3880566 B2 2007.2.14

も盛んに行われている。

【0012】

シュードモナスオレオボランスを用いて、側鎖にプロモ基を有するポリヒドロキシアルカノエートを生産し、アセチル化マルトースのチオール化物を側鎖に修飾し、その溶解性や親水性の異なるポリヒドロキシアルカノエートを合成したことが報告されている (Macromol. Rapid Commun., 20号、1999年、p. 91-94 (非特許文献8))。

【0013】

シュードモナス・オレオボランス (Pseudomonas oleovorans) を用いて側鎖にビニル基を有するポリエステルを生産し、ポリエステル分子内のビニル基を酸化することにより、エポキシ基を側鎖に有するポリエステルを生産したことが報告されている (Polymer, 41号、2000年、p. 1703-1709 (非特許文献9))。

【0014】

シュードモナス・オレオボランス (Pseudomonas oleovorans) を用いて側鎖にビニル基を有するポリエステルを生産し、ビニル基をエポキシ化することにより、エポキシ基を側鎖に有するポリエステルを生産したことが報告されている (Macromolecules, 31号、1998年、p. 1480-1486 (非特許文献10))。

【0015】

ポリエステル側鎖のビニル基を利用し、ポリエステル分子内の架橋反応を行い、ポリエステルの物性を改良したことが報告されている (Polymer, 35号、1994年、p. 2090-2097 (非特許文献11))。

【0016】

ユニット中に活性基を有するPHAの物性を変化させ、ポリマーとして実際に利用していくために、活性基を有するユニット以外のユニットを含むPHA共重合体を微生物合成することが検討されており、シュードモナスオレオボランス (Pseudomonas oleovorans) を用いて、11-プロモウンデカン酸、8-プロモオクタン酸、6-プロモヘキササン酸といった $\omega$ -プロモアルカン酸とn-ノナン酸の共存下で3-ヒドロキシ $\omega$ -プロモアルカン酸ユニットと直鎖アルカン酸ユニットを含むPHA共重合体を生産した例が報告されている (Macromolecules, 25号、1992年、p. 1852-1857 (非特許文献12))。

【0017】

このように、ユニット中にプロモ基やビニル基のような反応性が高い活性基を有するPHAでは、様々な官能基の導入や、化学的変換を施すことが可能であり、また、ポリマーの架橋点ともなり得るため、活性基を有するPHAは、PHAの多機能化を図る上で非常に有効な方法であると言える。

【特許文献1】特許第2989175号公報

【非特許文献1】Makromol. Chem., 191号、1990年、p. 1957-1965

【非特許文献2】Macromolecules, 24号、1991年、p. 5256-5260

【非特許文献3】Macromolecules, 29号、1996年、p. 1762-1766

【非特許文献4】Macromolecules, 32号、1999年、p. 2889-2895

【非特許文献5】Macromol. Chem. Phys., 195号、1994年、p. 1665-1672

【非特許文献6】Can. J. Microbiol., 41号、1995年、p. 32-43

(16)

JP 3880566 B2 2007.2.14

【非特許文献7】Polymer International, 39号、1996年、p. 205-213

【非特許文献8】Macromol. Rapid Commun., 20号、1999年、p. 91-94

【非特許文献9】Polymer, 41号、2000年、p. 1703-1709

【非特許文献10】Macromolecules, 31号、1998年、p. 1480-1486

【非特許文献11】Polymer, 35号、1994年、p. 2090-2097

【非特許文献12】Macromolecules, 25号、1992年、p. 1852-1857

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0018】

しかしながら、プロモ基を活性基とするPHAを微生物合成する場合は、得られるPHAの生産性が低く、PHA共重合体を微生物合成した場合は、プロモ基のユニット比を高くすることや、ユニット比を制御することが困難であった。

【0019】

また、ビニル基を活性基とするPHAの場合も、アルキル鎖の先端にビニル基がある場合には、ガラス転移温度や融点が低く、ポリマーの加工上及び使用上好ましい物性とは言えなかった。

【0020】

以上の点から、活性基を有するPHAの微生物による生産性が高く、活性基を有する側鎖のユニット比を制御でき、さらにポリマーとしての応用が制限されないように物性を任意に制御し得るようなPHA及びその製造方法が求められていた。

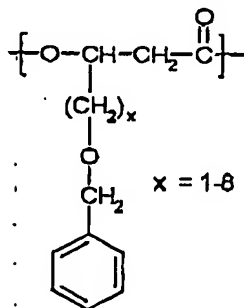
【課題を解決するための手段】

【0021】

本発明者らは上記の課題を解決すべく鋭意研究の結果、反応性の高い（フェニルメチル）オキシ構造を活性基として有するユニットを含むPHAを微生物合成する方法を見出し、本発明に至った。即ち、本発明は、化学式（1）：

【0022】

【化1】



(1)

（xは化学式中に示した範囲内で任意の一つ以上の整数値をとり得る）  
 に示す3-ヒドロキシ- $\omega$ -〔（フェニルメチル）オキシ〕アルカン酸のモノマーユニットを含むポリヒドロキシアルカノエートである。

【0023】

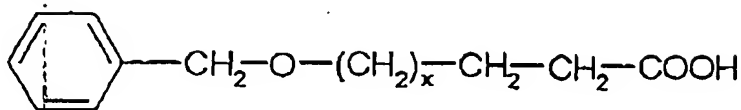
また本発明は、化学式（19）：

【0024】

(17)

JP 3880566 B2 2007.2.14

【化2】

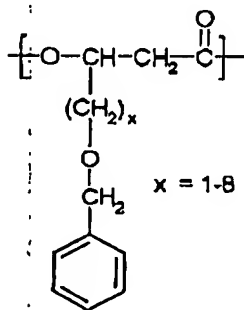
 $x = 1-8$ 

(19)

(xは化学式中に示した範囲内で任意の一つ以上の整数値をとり得る)  
 で示すω-[(フェニルメチル)オキシ]アルカン酸を含む条件下で、  
 前記化学式(19)で示すω-[(フェニルメチル)オキシ]アルカン酸を原料として、  
 化学式(1)：

【0025】

【化3】



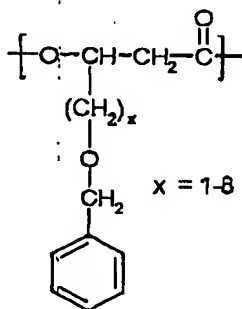
(1)

(xは化学式中に示した範囲内で任意の一つ以上の整数値をとり得る)  
 で示す3-ヒドロキシω-[(フェニルメチル)オキシ]アルカン酸のモノマーユニットを含むポリヒドロキシアлкаノエートを生産する能力を有する微生物により生合成せしめることを特徴とする、

前記化学式(1)：

【0026】

【化4】



(1)

(xは化学式中に示した範囲内で任意の一つ以上の整数値をとり得る)  
 で示す3-ヒドロキシω-[(フェニルメチル)オキシ]アルカン酸のモノマーユニットを分子中に含むポリヒドロキシアлкаノエートの製造方法である。

【発明の効果】

【0027】

本発明により、新規ポリヒドロキシアлкаノエート共重合体である、側鎖に[(フェニルメチル)オキシ]構造を有するユニットを含むポリヒドロキシアлкаノエート及び、側鎖に[(フェニルメチル)オキシ]構造を有するユニットと、側鎖にフェニル構造、チエニル構造、シクロヘキシル構造のいずれかを有する残基を含むユニットとを分子中に同時に含むポリヒドロキシアлкаノエートが提供された。

【0028】

(18)

JP 3880566 B2 2007.2.14

また、PHAの生産性が高く、[(フェニルメチル)オキシ]構造を有する側鎖のユニット比を制御でき、さらに生産されるPHAの物性を制御し得るPHAの製造方法が提供された。

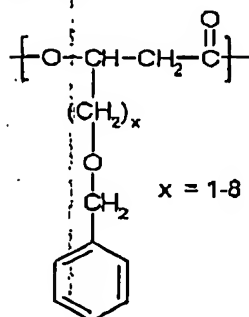
【発明を実施するための最良の形態】

【0029】

本発明のポリヒドロキシアлкаノエート(PHA)は、化学式(1)に示す3-ヒドロキシ- $\omega$  [(フェニルメチル)オキシ] アルカン酸ユニットを含むことを特徴とするポリヒドロキシアлкаノエートである。

【0030】

【化5】



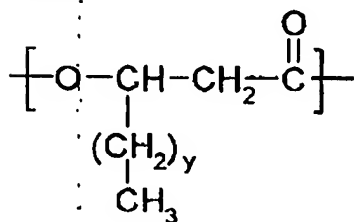
(1)

(xは化学式中に示した範囲内で任意の一つ以上の整数値をとり得る)

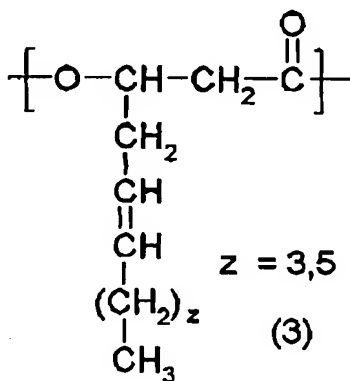
また、前記化学式(1)に示すユニット以外に、化学式(2)及び(3)に示すユニットの少なくとも一つを含むポリヒドロキシアлкаノエートである。

【0031】

【化6】



(2)



(3)

(y及びzは化学式(1)で示すユニットと独立して化学式中に示した範囲内で任意の一つ以上の整数値をとり得る。)

さらに、前記化学式(1)に示す3-ヒドロキシ- $\omega$  [(フェニルメチル)オキシ] アルカン酸ユニットが、

化学式(6)：

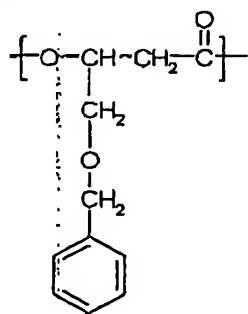
【0032】



(19)

JP 3880566 B2 2007.2.14

【化 7】



(6)

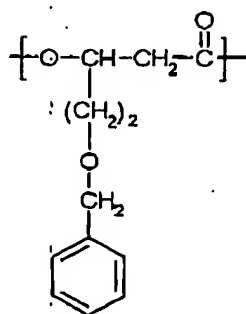
10

に示す3-ヒドロキシ-4-[(フェニルメチル)オキシ]酪酸ユニット、及び

化学式(7) :

【0033】

【化 8】



(7)

20

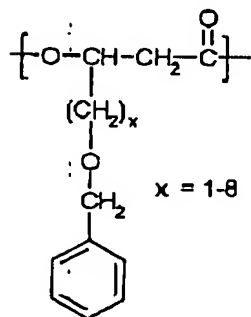
に示す3-ヒドロキシ-5-[(フェニルメチル)オキシ]古草酸ユニット、  
のうちのいずれか一つ以上であるポリヒドロキシアルカノエートである。

【0034】

特に、前記化学式(1) :

【0035】

【化 9】



(1)

30

40

(xは化学式中に示した罫囲内で任意の~つ以上の整数値をとり得る)

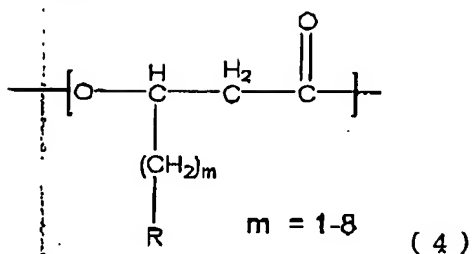
に示す3-ヒドロキシ-ω-[(フェニルメチル)オキシ]アルカン酸ユニットと、  
化学式(4) :

【0036】

(20)

JP 3880566 B2 2007.2.14

【化1.0】



( $m$ は化学式中に示した範囲内で任意の一つ以上の整数値をとり得る； $\text{R}$ はフェニル構造  
 或いはチエニル構造のいずれかの構造を有する残基を含んでいる)

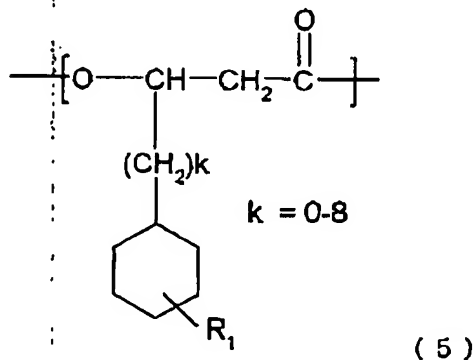
で示すユニット、

もしくは

化学式(5)：

【0037】

【化1.1】



(式中、 $\text{R}_1$ はシクロヘキシル基への置換基を示し、 $\text{R}_1$ は $\text{H}$ 原子、 $\text{CN}$ 基、 $\text{NO}_2$ 基、ハ  
 ロゲン原子、 $\text{CH}_3$ 基、 $\text{C}_2\text{H}_5$ 基、 $\text{C}_3\text{H}_7$ 基、 $\text{CF}_3$ 基、 $\text{C}_2\text{F}_5$ 基または $\text{C}_3\text{F}_7$ 基であり、  
 $k$ は化学式中に示した範囲内で任意の一つ以上の整数値をとり得る)

に示す3-ヒドロキシ- $\omega$ -シクロヘキシルアルカン酸ユニットと

を少なくとも分子中に同時に含むポリヒドロキシルアルカノエートである。

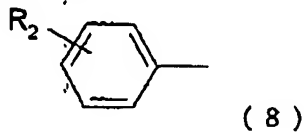
【0038】

また、前記化学式(4)における $\text{R}$ 、即ちフェニル構造或いはチエニル構造のいずれか  
 の構造を有する残基が、

化学式(8)：

【0039】

【化1.2】



(式中、 $\text{R}_2$ は芳香環への置換基を示し、 $\text{R}_2$ は $\text{H}$ 原子、ハロゲン原子、 $\text{CN}$ 基、 $\text{NO}_2$ 基  
 、 $\text{CH}_3$ 基、 $\text{C}_2\text{H}_5$ 基、 $\text{C}_3\text{H}_7$ 基、 $\text{CH}=\text{CH}_2$ 基、 $\text{COOR}_3$  ( $\text{R}_3$ ： $\text{H}$ 原子、 $\text{Na}$ 原子、  
 $\text{K}$ 原子のいずれかを表す)、 $\text{CF}_3$ 基、 $\text{C}_2\text{F}_5$ 基または $\text{C}_3\text{F}_7$ 基であり、複数のユニット  
 が存在する場合、 $\text{R}_2$ は、ユニット毎に異なってもよい。)

で示される残基群、

化学式(9)：

【0040】

20

30

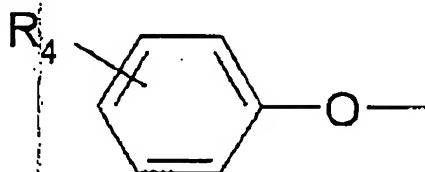
40

50

(21)

JP 3880566 B2 2007.2.14

【化13】



(9)

(式中、 $R_4$ は芳香環への置換基を示し、 $R_4$ はH原子、ハロゲン原子、CN基、 $\text{NO}_2$ 基、 $\text{CH}_3$ 基、 $\text{C}_2\text{H}_5$ 基、 $\text{C}_3\text{H}_7$ 基、 $\text{SCH}_3$ 基、 $\text{CF}_3$ 基、 $\text{C}_2\text{F}_5$ 基または $\text{C}_3\text{F}_7$ 基であり、複数のユニットが存在する場合、 $R_4$ は、異なってもよい。)

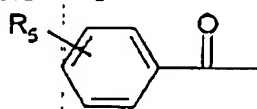
10

で示される残基群、

化学式(10)：

【0041】

【化14】



(10)

(式中、 $R_5$ は芳香環への置換基を示し、 $R_5$ はH原子、ハロゲン原子、CN基、 $\text{NO}_2$ 基、 $\text{CH}_3$ 基、 $\text{C}_2\text{H}_5$ 基、 $\text{C}_3\text{H}_7$ 基、 $\text{CF}_3$ 基、 $\text{C}_2\text{F}_5$ 基または $\text{C}_3\text{F}_7$ 基であり、複数のユニットが存在する場合、 $R_5$ は、ユニット毎に異なってもよい。)

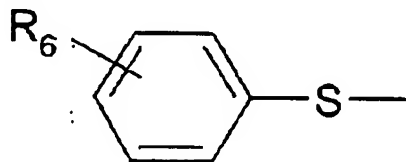
20

で示される残基群、

化学式(11)：

【0042】

【化15】



(11)

30

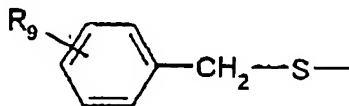
(式中、 $R_6$ は芳香環への置換基を示し、 $R_6$ はH原子、ハロゲン原子、CN基、 $\text{NO}_2$ 基、 $\text{COOR}_7$ 、 $\text{SO}_2\text{R}_8$  ( $R_7$ : H、Na、K、 $\text{CH}_3$ 、 $\text{C}_2\text{H}_5$ のいずれかを表し、 $R_8$ : OH、ONa、OK、ハロゲン原子、 $\text{OCH}_3$ 、 $\text{OC}_2\text{H}_5$ のいずれかを表す)、 $\text{CH}_3$ 基、 $\text{C}_2\text{H}_5$ 基、 $\text{C}_3\text{H}_7$ 基、 $(\text{CH}_3)_2\text{-CH}$ 基または $(\text{CH}_3)_3\text{-C}$ 基であり、複数のユニットが存在する場合、 $R_6$ は、ユニット毎に異なってもよい。)

で示される残基群、

化学式(12)：

【0043】

【化16】



(12)

40

(式中、 $R_9$ は芳香環への置換基を示し、 $R_9$ はH原子、ハロゲン原子、CN基、 $\text{NO}_2$ 基、 $\text{COOR}_{10}$ 、 $\text{SO}_2\text{R}_{11}$  ( $R_{10}$ : H、Na、K、 $\text{CH}_3$ 、 $\text{C}_2\text{H}_5$ のいずれかを表し、 $R_{11}$ : OH、ONa、OK、ハロゲン原子、 $\text{OCH}_3$ 、 $\text{OC}_2\text{H}_5$ のいずれかを表す)、 $\text{CH}_3$ 基、 $\text{C}_2\text{H}_5$ 基、 $\text{C}_3\text{H}_7$ 基、 $(\text{CH}_3)_2\text{-CH}$ 基または $(\text{CH}_3)_3\text{-C}$ 基であり、複数のユニ

50

(22)

JP 3880566 B2 2007.2.14

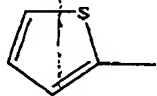
ットが存在する場合、 $R_9$ は、ユニット毎に異なってもよい。) 10

で示される残基群、

化学式(13) :

【0044】

【化17】



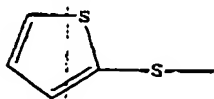
(13)

で示される残基、

化学式(14) :

【0045】

【化18】



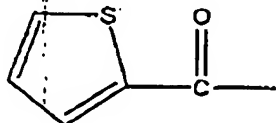
(14)

で示される残基、

化学式(15) :

【0046】

【化19】



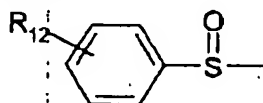
(15)

で示される残基、

化学式(16) :

【0047】

【化20】



(16)

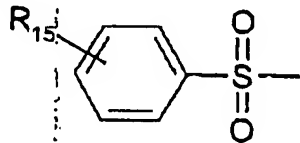
(式中、 $R_{12}$ は芳香環への置換基を示し、 $R_{12}$ はH原子、ハロゲン原子、CN基、 $\text{NO}_2$ 基、 $\text{COOR}_{13}$ 、 $\text{SO}_2\text{R}_{14}$  ( $R_{13}$ : H、Na、K、 $\text{CH}_3$ 、 $\text{C}_2\text{H}_5$ のいずれかを表し、 $R_{14}$ : OH、ONa、OK、ハロゲン原子、 $\text{OCH}_3$ 、 $\text{OC}_2\text{H}_5$ のいずれかを表す)、 $\text{CH}_3$ 基、 $\text{C}_2\text{H}_5$ 基、 $\text{C}_3\text{H}_7$ 基、 $(\text{CH}_2)_2\text{-CH}$ 基または $(\text{CH}_2)_3\text{-C}$ 基であり、複数のユニットが存在する場合、 $R_{12}$ は、ユニット毎に異なってもよい。)

で示される残基群、及び 40

化学式(17) :

【0048】

【化21】



(17)

(式中、 $R_{15}$ は芳香環への置換基を示し、 $R_{15}$ はH原子、ハロゲン原子、CN基、 $\text{NO}_2$

50

(23)

JP 3880566 B2 2007.2.14

基、 $\text{COOR}_{15}$ 、 $\text{SO}_2\text{R}_{17}$  ( $\text{R}_{15}$ : H、Na、K、 $\text{CH}_3$ 、 $\text{C}_2\text{H}_5$ のいずれかを表し、 $\text{R}_{17}$ : OH、ONa、OK、ハロゲン原子、 $\text{OCH}_3$ 、 $\text{OC}_2\text{H}_5$ のいずれかを表す)、 $\text{CH}_3$ 基、 $\text{C}_2\text{H}_5$ 基、 $\text{C}_3\text{H}_7$ 基、 $(\text{CH}_3)_2\text{-CH}$ 基または $(\text{CH}_3)_3\text{-C}$ 基であり、複数のユニットが存在する場合、 $\text{R}_{15}$ は、ユニット毎に異なってもよい。)で示される残基群

からなる群より選択される1つ以上の残基であるポリヒドロキシルアルカノエートである。

【0049】

特に、数平均分子量が1000から1000000の範囲であるポリヒドロキシルアルカノエートである。

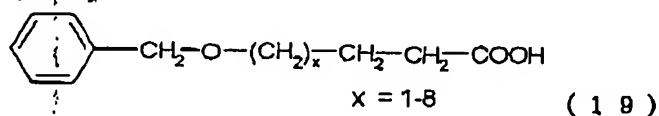
【0050】

本発明のポリヒドロキシルアルカノエートの製造方法は、

化学式(19)：

【0051】

【化22】



(xは化学式中に示した範囲内で任意の一つ以上の整数値をとり得る)

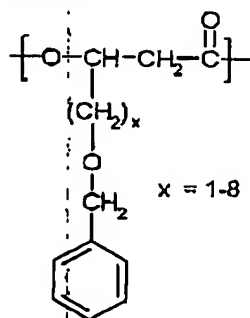
で示すω-[(フェニルメチル)オキシ]アルカン酸を含む条件下で、

前記化学式(19)で示すω-[(フェニルメチル)オキシ]アルカン酸を原料として、

化学式(1)：

【0052】

【化23】



(xは化学式中に示した範囲内で任意の一つ以上の整数値をとり得る)

で示す3-ヒドロキシω-[(フェニルメチル)オキシ]アルカン酸ユニットを分子中に含むポリヒドロキシルアルカノエートを生産する能力を有する微生物により生合成せしめることを特徴とする、

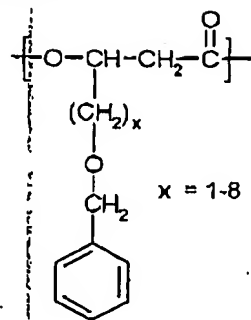
前記化学式(1)：

【0053】

(24)

JP 3880566 B2 2007.2.14

【化24】



(1)

10

(xは化学式中に示した範囲内で任意の一つ以上の整数値をとり得る)  
 で示す3-ヒドロキシーω-[(フェニルメチル)オキシ]アルカン酸ユニットを分子中に含むポリヒドロキシアлкノエートの製造方法である。

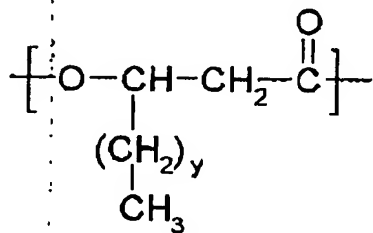
【0054】

また、前記化学式(1)で示されるユニットに加えて、下記化学式(2)及び(3)に示されるユニットの少なくとも一つを含むポリヒドロキシアлкノエートの製造方法である。

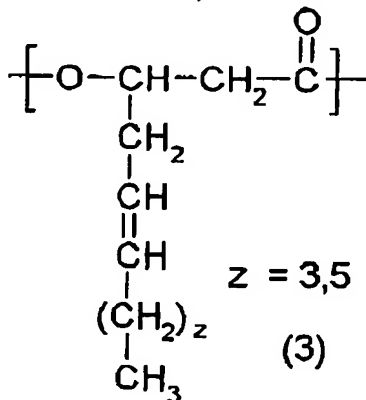
【0055】

【化25】

20

 $y = 1-8$ 

(2)

 $z = 3,5$ 

(3)

30

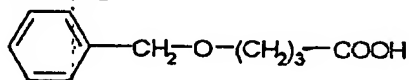
(y及びzは化学式(1)で示すユニットと独立して化学式中に示した範囲内で任意の一つ以上の整数値をとり得る。)

さらに、前記化学式(19)に示すω-[(フェニルメチル)オキシ]アルカン酸が、化学式(23)：

【0056】

【化26】

40



(23)

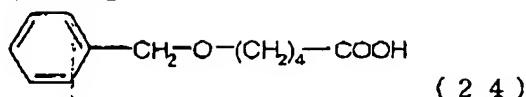
に示す4-[(フェニルメチル)オキシ]酪酸、及び化学式(24)：

【0057】

(25)

JP 3880566 B2 2007.2.14

【化27】



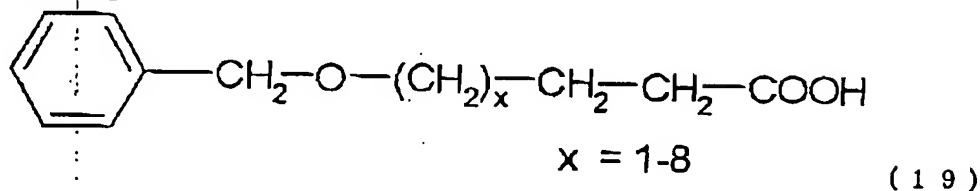
に示すω-[(フェニルメチル)オキシ]吉草酸  
 のうちのいずれか1つ以上であるポリヒドロキシアルカノエートの製造方法である。

【0058】

特に、前記化学式(19)：

【0059】

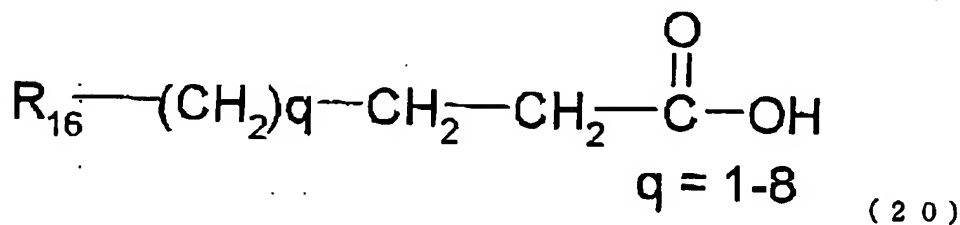
【化28】



(xは化学式中に示した範囲内で任意の一つ以上の整数値をとり得る)  
 で示すω-[(フェニルメチル)オキシ]アルカン酸と、  
 化学式(20)：

【0060】

【化29】



(qは化学式中に示した範囲内で任意の一つ以上の整数値をとり得る；R<sub>16</sub>はフェニル構造、或いはチエニル構造のいずれかの構造を有する残基を含んでいる)

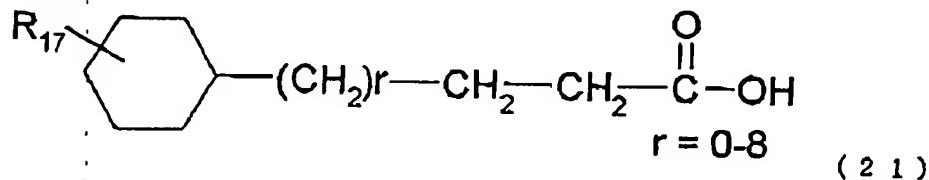
で示す化合物、

もしくは

化学式(21)：

【0061】

【化30】



(式中、R<sub>17</sub>はシクロヘキシル基への置換基を示し、R<sub>17</sub>はH原子、CN基、NO<sub>2</sub>基、ハロゲン原子、CH<sub>3</sub>基、C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>基、C<sub>3</sub>H<sub>7</sub>基、CF<sub>3</sub>基、C<sub>2</sub>F<sub>5</sub>基またはC<sub>3</sub>F<sub>7</sub>基であり、また、rは化学式中に示した範囲内で任意の一つ以上の整数値をとり得る)

で示すω-シクロヘキシルアルカン酸と

を含む条件下で、

前記化学式(19)で示すω-[(フェニルメチル)オキシ]アルカン酸、及び前記化学式(20)で示す化合物もしくは前記化学式(21)で示すω-シクロヘキシルアルカン酸を原料として、

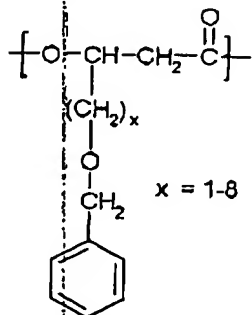
(26)

JP 3880566 B2 2007.2.14

前記化学式 (1) :

【0062】

【化31】



(1)

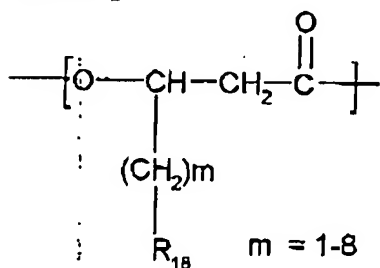
(xは化学式中に示した範囲内で任意の一つ以上の整数値をとり得る)

で示す3-ヒドロキシ-ω-[(フェニルメチル)オキシ]アルカン酸ユニットと、

化学式 (22) :

【0063】

【化32】



(22)

(mは化学式中に示した範囲内で任意の一つ以上の整数値をとり得る；R<sub>18</sub>はフェニル構造或いはチエニル構造のいずれかの構造を有する残基を含んでいる)

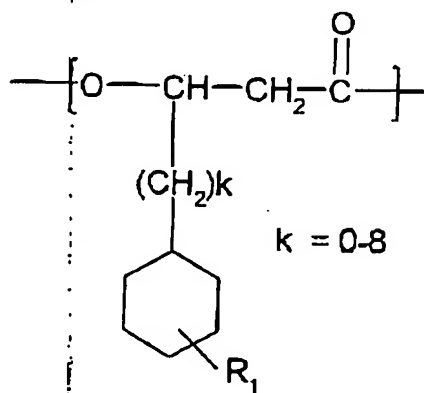
で示すユニット

もしくは

化学式 (5) :

【0064】

【化33】



(5)

(式中 R<sub>1</sub>はシクロヘキシル基への置換基を示し、R<sub>1</sub>はH原子、CN基、NO<sub>2</sub>基、ハロゲン原子、CH<sub>3</sub>基、C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>基、C<sub>3</sub>H<sub>7</sub>基、CF<sub>3</sub>基、C<sub>2</sub>F<sub>5</sub>基またはC<sub>3</sub>F<sub>7</sub>基であり、

10

20

30

40

50



(27)

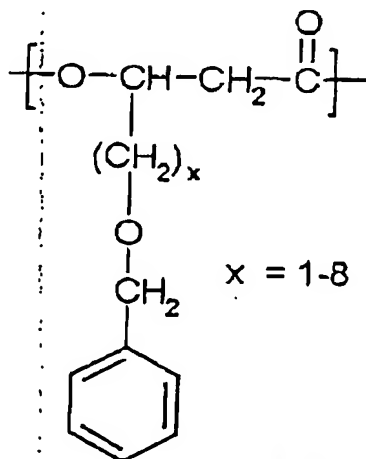
JP 3880566 B2 2007.2.14

また、 $k$  は化学式中に示した範囲内で任意の一つ以上の整数値をとり得る)  
 に示す 3-ヒドロキシ- $\omega$ -シクロヘキシルアルカン酸ユニットと  
 を少なくとも分子中に同時に含むポリヒドロキシルアルカノエートを生産する能力を有する  
 微生物により生合成せしめることを特徴とする、

前記化学式 (1) :

【0065】

【化34】



10

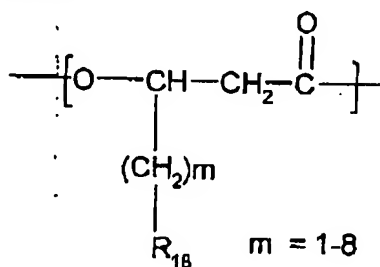
20

(1)

( $x$  は化学式中に示した範囲内で任意の一つ以上の整数値をとり得る)  
 で示す 3-ヒドロキシ- $\omega$ -[(フェニルメチル) オキシ] アルカン酸ユニットと、  
 前記化学式 (22) :

【0066】

【化35】



30

(22)

( $m$  は化学式中に示した範囲内で任意の一つ以上の整数値をとり得る； $\text{R}_{18}$  はフェニル構造  
 あるいはチエニル構造のいずれかの構造を有する残基を含んでいる)  
 で示すユニット

もしくは

前記化学式 (5) :

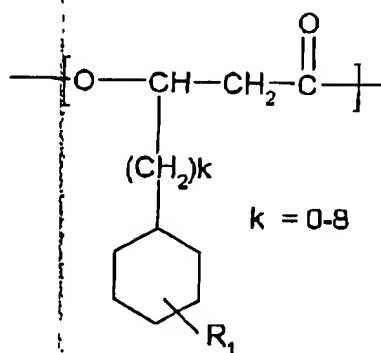
【0067】

40

(28)

JP 3880566 B2 2007.2.14

【化36】



10

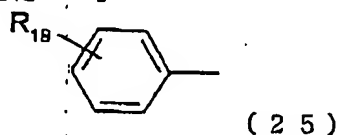
(式中、 $R_1$ はシクロヘキシル基への置換基を示し、 $R_1$ はH原子、CN基、 $NO_2$ 基、ハロゲン原子、 $CH_3$ 基、 $C_2H_5$ 基、 $C_3H_7$ 基、 $CF_3$ 基、 $C_2F_5$ 基または $C_3F_7$ 基であり、また、 $k$ は化学式中に示した範囲内で任意の一つ以上の整数値をとり得る) 10  
 に示す3-ヒドロキシ- $\omega$ -シクロヘキシルアルカン酸ユニットと  
 を少なくとも分子中に同時に含むポリヒドロキシアルカノエートの製造方法である。

【0068】

また、前記化学式(20)における $R_{16}$ 及び前記化学式(22)における $R_{18}$ 、即ちフ 20  
 エニル構造或いはチエニル構造のいずれかの構造を有する残基が、  
 化学式(25)：

【0069】

【化37】

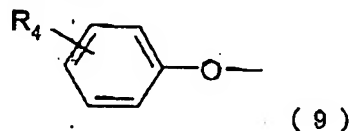


(式中、 $R_{19}$ は芳香環への置換基を示し、 $R_{19}$ はH原子、ハロゲン原子、CN基、 $NO_2$  30  
 基、 $CH_3$ 基、 $C_2H_5$ 基、 $C_3H_7$ 基、 $CH=CH_2$ 基、 $CF_3$ 基、 $C_2F_5$ 基または $C_3F_7$ 基  
 であり、複数のユニットが存在する場合、 $R_{19}$ は、ユニット毎に異なってもよい。) 30  
 で示される残基群、

化学式(9)：

【0070】

【化38】



40

(式中、 $R_4$ は芳香環への置換基を示し、 $R_4$ はH原子、ハロゲン原子、CN基、 $NO_2$ 基  
 、 $CH_3$ 基、 $C_2H_5$ 基、 $C_3H_7$ 基、 $SC_2H_5$ 基、 $CF_3$ 基、 $C_2F_5$ 基または $C_3F_7$ 基であり、  
 複数のユニットが存在する場合、 $R_4$ は、ユニット毎に異なってもよい。) 40  
 で示される残基群、

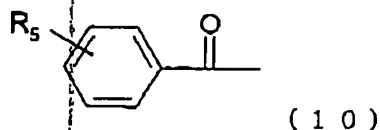
化学式(10)：

【0071】

(29)

JP 3880566 B2 2007.2.14

【化39】



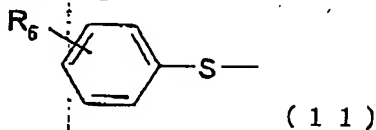
(式中、 $R_5$ は芳香環への置換基を示し、 $R_5$ はH原子、ハロゲン原子、CN基、 $NO_2$ 基、 $CH_3$ 基、 $C_2H_5$ 基、 $C_3H_7$ 基、 $CF_3$ 基、 $C_2F_5$ 基または $C_3F_7$ 基であり、複数のユニットが存在する場合、 $R_5$ は、ユニット毎に異なってもよい。)

で示される残基群、

化学式(11)：

【0072】

【化40】



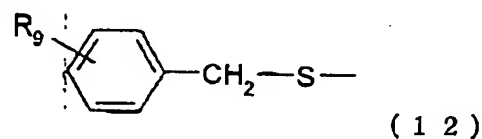
(式中、 $R_6$ は芳香環への置換基を示し、 $R_6$ はH原子、ハロゲン原子、CN基、 $NO_2$ 基、 $COOR_7$ 、 $SO_2R_8$  ( $R_7$ : H、Na、K、 $CH_3$ 、 $C_2H_5$ のいずれかを表し、 $R_8$ : O、H、ONa、OK、ハロゲン原子、 $OCH_3$ 、 $OC_2H_5$ のいずれかを表す)、 $CH_3$ 基、 $C_2H_5$ 基、 $C_3H_7$ 基、 $(CH_3)_2-CH$ 基または $(CH_3)_3-C$ 基であり、複数のユニットが存在する場合、 $R_6$ は、ユニット毎に異なってもよい。)

で示される残基群、

化学式(12)：

【0073】

【化41】



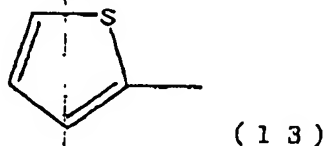
(式中、 $R_9$ は芳香環への置換基を示し、 $R_9$ はH原子、ハロゲン原子、CN基、 $NO_2$ 基、 $COOR_{10}$ 、 $SO_2R_{11}$  ( $R_{10}$ : H、Na、K、 $CH_3$ 、 $C_2H_5$ のいずれかを表し、 $R_{11}$ : OH、ONa、OK、ハロゲン原子、 $OCH_3$ 、 $OC_2H_5$ のいずれかを表す)、 $CH_3$ 基、 $C_2H_5$ 基、 $C_3H_7$ 基、 $(CH_3)_2-CH$ 基または $(CH_3)_3-C$ 基であり、複数のユニットが存在する場合、 $R_9$ は、ユニット毎に異なってもよい。)

で示される残基群、

化学式(13)：

【0074】

【化42】



で示される残基、

化学式(14)：

【0075】

10

20

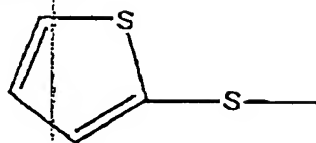
30

40

(30)

JP 3880566 B2 2007.2.14

【化43】



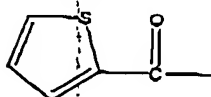
(14)

で示される残基、

化学式(15):

【0076】

【化44】



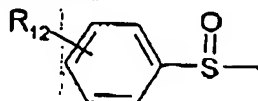
(15)

で示される残基、

化学式(16):

【0077】

【化45】



(16)

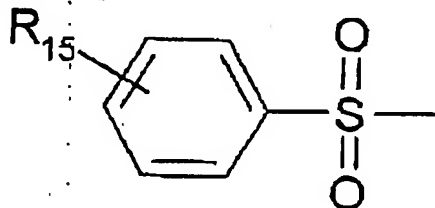
(式中、 $R_{12}$ は芳香環への置換基を示し、 $R_{12}$ はH原子、ハロゲン原子、CN基、 $NO_2$ 基、 $COOR_{13}$ 、 $SO_2R_{14}$  ( $R_{13}$ : H、Na、K、 $CH_3$ 、 $C_2H_5$ のいずれかを表し、 $R_{14}$ : OH、ONa、OK、ハロゲン原子、 $OCH_3$ 、 $OC_2H_5$ のいずれかを表す)、 $CH_3$ 基、 $C_2H_5$ 基、 $C_3H_7$ 基、 $(CH_3)_2-CH$ 基または $(CH_3)_3-C$ 基であり、複数のユニットが存在する場合、 $R_{12}$ は、ユニット毎に異なってもよい。)

で示される残基群、及び

化学式(17):

【0078】

【化46】



(17)

(式中、 $R_{15}$ は芳香環への置換基を示し、 $R_{15}$ はH原子、ハロゲン原子、CN基、 $NO_2$ 基、 $COOR_{16}$ 、 $SO_2R_{17}$  ( $R_{16}$ : H、Na、K、 $CH_3$ 、 $C_2H_5$ のいずれかを表し、 $R_{17}$ : OH、ONa、OK、ハロゲン原子、 $OCH_3$ 、 $OC_2H_5$ のいずれかを表す)、 $CH_3$ 基、 $C_2H_5$ 基、 $C_3H_7$ 基、 $(CH_3)_2-CH$ 基または $(CH_3)_3-C$ 基であり、複数のユニットが存在する場合、 $R_{15}$ は、ユニット毎に異なってもよい。)

で示される残基群

からなる群より選択される1つ以上の残基であるポリヒドロキシルアルカノエートの製造方法である。

【0079】

なお、前述した化学式の有するx、y、z、m、q、r、k、R及びR1~19は、こ

10

20

30

40

50

(31)

JP 3880566 B2 2007.2.14

れらをそれぞれ含むモノマーユニット又はモノマーの2種以上が用いられている場合に、各モノマーユニット又はモノマーごとに独立して上記の意味を表す。

## 【0080】

本発明のポリヒドロキシアルカノエートの製造方法は、前記化学式(19)で示す $\omega$ -[(フェニルメチル)オキシ]アルカン酸に加えて、ペプチド類、酵母エキス、有機酸及びその塩、アミノ酸及びその塩、糖類、並びに、炭素数4から12の直鎖アルカン酸及びその塩からなる群より選択される少なくとも1種類を含む培地中で、前記微生物を培養することを特徴とするポリヒドロキシアルカノエートの製造方法とすることができる。さらに、前記微生物の培養において、培地中に含有されるペプチド類がポリペプトンであり、また、培地中に含有される有機酸或いはその塩が、ヒルビン酸、オキサロ酢酸、クエン酸、イソクエン酸、ケトグルタル酸、コハク酸、フマル酸、リンゴ酸、乳酸、及びこれらの塩からなる群より選択される1つ以上の化合物であり、また、培地中に含有されるアミノ酸或いはその塩が、グルタミン酸、アシパラギン酸、及びこれらの塩からなる群より選択される1つ以上の化合物であり、また、培地中に含有される糖類が、グリセロアルデヒド、エリトロース、アラビノース、キシロース、グルコース、ガラクトース、マンノース、フルクトース、グリセロール、エリトリール、キシリトリール、グルコン酸、グルクロン酸、ガラクトツロン酸、マルトース、スクロース、及びラクトースからなる群より選択される1つ以上の化合物とすることができる。

## 【0081】

本発明のポリヒドロキシアルカノエートの製造方法における微生物の培養条件の詳細は、以下のとおりである。

## 【0082】

リン酸緩衝液及びアンモニウム塩或いは硝酸塩を基本とした無機塩培地に、以下に示すように種々の必要基質及び栄養素を加える。

## 【0083】

目的とする前記化学式(1)で示す3-ヒドロキシ $\omega$ -[(フェニルメチル)アルカン酸ユニットを含むポリヒドロキシアルカノエートを生産するための基質として、前記化学式(19)で示す $\omega$ -[(フェニルメチル)オキシ]アルカン酸を含むことが好ましく、より好ましくは、培地あたり0.01%から1%(w/v)、更に好ましくは0.02%から0.2%の割合で含有していることが望ましい。

## 【0084】

また、3-ヒドロキシ $\omega$ -[(フェニルメチル)オキシ]アルカン酸ユニットに加えて、前記化学式(22)に示すユニットもしくは前記化学式(5)に示す3-ヒドロキシ $\omega$ -シクロヘキシルアルカン酸ユニットとを少なくとも分子中に同時に含むポリヒドロキシアルカノエートを生産するためには、基質として前記化学式(19)で示す $\omega$ -[(フェニルメチル)オキシ]アルカン酸、及び前記化学式(20)で示す化合物もしくは前記化学式(21)で示す $\omega$ -シクロヘキシルアルカン酸を含むことが好ましく、より好ましくは、培地あたりそれぞれ0.01%から1%(w/v)、更に好ましくは0.02%から0.2%の割合で含有していることが望ましい。

## 【0085】

微生物増殖のための炭素源及び窒素源、ポリヒドロキシアルカノエート生産のためのエネルギー供給源として加える上記の共存基質濃度は、通常培地あたり0.1%から5%(w/v)、更に好ましくは0.2%から2%の割合で含有していることが望ましい。

## 【0086】

本発明で用いる培地としては、リン酸塩及びアンモニウム塩或いは硝酸塩等の窒素源を含む無機塩培地ならいかなる培地でも良いが、窒素源の濃度を調節することでPHAの生産性を向上せしめることが可能である。

## 【0087】

培養温度としては菌株が良好に増殖可能な温度であれば良く、15℃から37℃、更に好ましくは20℃から30℃程度が適当である。

(32)

JP 3880566 B2 2007.2.14

## 【0088】

培養方法としては、微生物が増殖し、PHAを生産する方法であればいかなるものでも良く、液体培養、固体培養等を問わない。また、通常のパッチ培養などの一段階培養の他に、一段階培養によって得られた菌体を一度回収し、それを新たに別の培地に添加し、再び培養を行うような二段階培養を用いることができる。また、この二段階培養をより簡便に行うため、菌体を回収せずに培養液にそのまま新たな培地を添加するフェド・パッチ培養を用いることも可能である。さらに連続培養を用いることもできる。

## 【0089】

培養形態としても、フラスコ等の培養容器を振盪する方法、フアーメンターによる方法等、いかなるものを用いても良い。

## 【0090】

微生物にPHAを生産・蓄積せしめる方法としては、上に示した方法の他に、一口十分に増殖させて後に、塩化アンモニウムのような窒素源を制限した培地へ菌体を移し、目的ユニットの基質となる化合物を加えた状態で更に培養すると生産性が向上する場合がある。

## 【0091】

更に、上記のような条件下で微生物を培養し、微生物が産生した前記化学式(1)で示す3-ヒドロキシ-ω-[(フェニルメチル)オキシ]アルカン酸ユニットを含むポリヒドロキシアルカノエートを微生物細胞から回収する工程を有することができる。

## 【0092】

微生物細胞から目的のPHAを回収する方法としては、通常行なわれている方法を適用することができる。例えば、クロロホルム、ジクロロメタン、酢酸エチル、アセトンなどの有機溶媒による抽出が最も簡便ではあるが、それ以外にジオキサン、テトラヒドロフラン、アセトニトリルが用いられる場合もある。また、有機溶媒が使用しにくい環境中においては、SDS等の界面活性剤による処理、リゾチーム等の酵素による処理、次亜塩素酸塩、アンモニア、EDTA等の薬剤による処理、或いは超音波破砕法、ホモジナイザー法、圧力破砕法、ビーズ衝撃法、摩砕法、播漬法、凍結融解法のいずれかの方法を用いて微生物細胞を物理的に破砕することによって、PHA以外の菌体成分を除去して、PHAを回収する方法を用いることもできる。

## 【0093】

本発明の製造方法で用いる微生物としては、前記条件を満たす能力を有する微生物であれば如何なる微生物でも良いが、その中でも特にシュードモナス(*Pseudomonas*)属に属する微生物が望ましく、更に詳しくはシュードモナスチコリアイ(*Pseudomonascichorii*)、シュードモナスプチダ(*Pseudomonasputida*)、シュードモナスフルオレセンス(*Pseudomonasfluorescens*)、シュードモナスオレオボランス(*Pseudomonasoleovorans*)、シュードモナスアルギノーサ(*Pseudomonasaeruginosa*)、シュードモナススツツエリ(*Pseudomonasstutzeri*)、シュードモナスジェッセニイ(*Pseudomonasjessenii*)等が望ましい。更に詳しくは、シュードモナスチコリアイYN2株(*Pseudomonascichorii*YN2;FERMBP-7375)、シュードモナスチコリアイH45株(*Pseudomonascichorii*H45;FERMBP-7374)、シュードモナスジェッセニイP161株(*Pseudomonasjessenii*P161;FERMBP-7376)が挙げられる。これら3種の微生物は独立行政法人産業技術総合研究所(旧通商産業省工業技術院)生命工学工業技術研究所特許微生物寄託センターに寄託されており、特開2002-80571号公報に記載されている微生物である。

## 【0094】

なお、本発明の微生物の培養、本発明の微生物によるPHAの生産と菌体への蓄積、並びに、本発明における菌体からのPHAの回収は、上記の方法に限定されるものではない。

10

20

30

40

50

(33)

JP 3880566 B2 2007.2.14

【0095】

本発明の一方法に用いた無機塩培地（M9培地）の組成を以下に示す。

【0096】

〔M9培地〕

 $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ : 6.3 g/L $\text{KH}_2\text{PO}_4$ : 3.0 g/L $\text{NH}_4\text{Cl}$ : 1.0 g/L $\text{NaCl}$ : 0.5 g/L、pH=7.0

更に、良好な増殖及びPHAの生産のためには、上記の無機塩培地に以下に示す微量成分溶液を0.3%（v/v）程度添加する必要がある。

【0097】

〔微量成分溶液〕

ニトリロ三酢酸: 1.5;  $\text{MgSO}_4$ : 3.0;  $\text{MnSO}_4$ : 0.5;  $\text{NaCl}$ : 1.0;  
 $\text{FeSO}_4$ : 0.1;  $\text{CaCl}_2$ : 0.1;  $\text{CoCl}_2$ : 0.1;  $\text{ZnSO}_4$ : 0.1;  $\text{CuSO}_4$ : 0.1;  $\text{AlK}(\text{SO}_4)_2$ : 0.1;  $\text{H}_3\text{BO}_3$ : 0.1;  $\text{Na}_2\text{MoO}_4$ : 0.1;  
 $\text{NiCl}_2$ : 0.1 (単位: g/L)

【実施例】

【0098】

実施例中の「%」は「%（w/v）」を示す。

【0099】

〔実施例1〕

D-グルコース0.5%、ポリペプトン0.1%、5-[(フェニルメチル)オキシ]吉草酸0.1%を含むM9培地200mLに、シュードモナス・チコリアイ・YN2株を接種し、30℃、125ストローク/分で振盪培養した。48時間後、菌体を遠心分離により回収し、D-グルコース0.5%、5-[(フェニルメチル)オキシ]吉草酸0.1%を含むM9培地200mLに再懸濁して、更に、30℃、125ストローク/分で振盪培養した。48時間後、菌体を遠心分離により回収し、冷メタノールにて一度洗浄して凍結乾燥した。

【0100】

この凍結乾燥ペレットを20mLクロロホルムに懸濁し、60℃で20時間攪拌してPHAを抽出した。抽出液を孔径0.45μmのメンブランフィルターで濾過した後、ロータリーエバポレーターで濃縮し、濃縮液を冷メタノールで再沈殿させ、更に沈殿のみを回収して真空乾燥してPHAを33mg得た。

【0101】

得られたPHAは、以下の条件でNMR分析を行った。

&lt;測定機器&gt;

FT-NMR: Bruker DPX400

共鳴周波数:  $^1\text{H}$ =400MHz

&lt;測定機器&gt;

測定核種:  $^1\text{H}$ 使用溶媒:  $\text{CDCl}_3$ 

測定温度: 室温

$^1\text{H}$ -NMRスペクトルチャートを図1に、その同定結果を表1にそれぞれ示す。

【0102】

(34)

JP 3880566 B2 2007.2.14

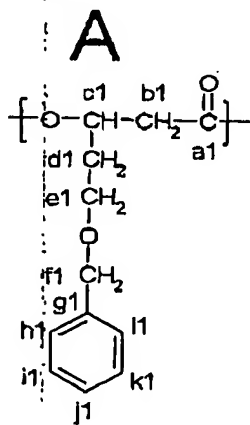
【表 1】

Chemical shift (ppm)	帰属	分裂	積分比
1. 86	d 1	m	2 H
2. 54	b 1	m	2 H
3. 44	e 1	m	2 H
4. 41	f 1	s	2 H
5. 31	c 1	m	1 H
7. 20~7. 31	h 1 i 1 j 1 k 1 l 1	m	5 H

表 1 に示す通り、当該 PHA は、以下の化学式 (26) で表される 3-ヒドロキシ-5-[(フェニルメチル) オキシ] 吉草酸をモノマーユニットとして含み、且つ 3-ヒドロキシ酪酸、3-ヒドロキシ吉草酸などの炭素数 4 から 12 までの飽和、不飽和脂肪酸である 3-ヒドロキシアルカン酸または 3-ヒドロキシアルケン酸をモノマーユニットとして含む、PHA であることが確認された。また、得られた PHA は、<sup>1</sup>H-NMR スペクトル積分比より、3-ヒドロキシ-5-[(フェニルメチル) オキシ] 吉草酸のモノマーユニットを 94.9 mol % 含むことがわかった。

【0103】

【化 47】



また、得られた PHA の分子量をゲルパーミエーションクロマトグラフィー (GPC; 東ソー HLC-8220、カラム; 東ソー TSK-GEL Super HM-H、溶媒; クロロホルム、ポリスチレン換算) により評価した結果、 $M_n = 123000$ 、 $M_w = 293000$ であった。

【0104】

【実施例 2】

D-グルコース 0.5%、5-[(フェニルメチル) オキシ] 吉草酸 0.1% とを含む M9 培地 200 mL に、シュドモナス・チコリアイ・YN2 株を接種し、30℃、125 ストローク/分で振盪培養した。48 時間後、菌体を遠心分離により回収し、D-グルコース 0.5%、5-[(フェニルメチル) オキシ] 吉草酸 0.1% を含む、発生源 (N



(35)

JP 3880566 B2 2007.2.14

H<sub>2</sub>CJ) を含まない M9 培地 200 mL に再懸濁して、更に、30℃、125 ストローク/分で振盪培養した。48 時間後、菌体を遠心分離により回収し、冷メタノールにて一度洗浄して凍結乾燥した。

【0105】

この凍結乾燥ペレットを 20 mL クロロホルムに懸濁し、60℃で 20 時間攪拌して PHA を抽出した。抽出液を孔径 0.45 μm のメンブランフィルターで濾過した後、ロータリーエバポレーターで濃縮し、濃縮液を冷メタノールで再沈殿させ、更に沈殿のみを回収して真空乾燥して PHA を 30 mg 得た。実施例 1 と同様の条件で NMR 分析を行った結果、得られた PHA は、化学式 (26) で表される 3-ヒドロキシ-5-[(フェニルメチル) オキシ] 吉草酸をモノマーユニットとして含み、且つ 3-ヒドロキシ酪酸、3-ヒドロキシ吉草酸などの炭素数 4 から 12 までの飽和、不飽和脂肪酸である 3-ヒドロキシアルカン酸または 3-ヒドロキシアルケン酸をモノマーユニットとして含む、PHA であることが確認された。また、得られた PHA は、<sup>1</sup>H-NMR スペクトル積分比より、3-ヒドロキシ-5-[(フェニルメチル) オキシ] 吉草酸のモノマーユニットを 92.6 mol % 含むことがわかった。

【0106】

【実施例 3】

D-グルコース 0.5%、ポリペプトン 0.1%、5-[(フェニルメチル) オキシ] 吉草酸 0.1% とを含む M9 培地 200 mL に、シュードモナス・チコリアイ・H45 株を接種し、30℃、125 ストローク/分で振盪培養した。48 時間後、菌体を遠心分離により回収し、D-グルコース 0.5%、5-[(フェニルメチル) オキシ] 吉草酸 0.1% を含む M9 培地 200 mL に再懸濁して、更に、30℃、125 ストローク/分で振盪培養した。48 時間後、菌体を遠心分離により回収し、冷メタノールにて一度洗浄して凍結乾燥した。

【0107】

この凍結乾燥ペレットを 20 mL クロロホルムに懸濁し、60℃で 20 時間攪拌して PHA を抽出した。抽出液を孔径 0.45 μm のメンブランフィルターで濾過した後、ロータリーエバポレーターで濃縮し、濃縮液を冷メタノールで再沈殿させ、更に沈殿のみを回収して真空乾燥して PHA を 31 mg 得た。実施例 1 と同様の条件で NMR 分析を行った結果、得られた PHA は、化学式 (26) で表される 3-ヒドロキシ-5-[(フェニルメチル) オキシ] 吉草酸のモノマーユニットを含み、且つ 3-ヒドロキシ酪酸、3-ヒドロキシ吉草酸などの炭素数 4 から 12 までの飽和、不飽和脂肪酸である 3-ヒドロキシアルカン酸または 3-ヒドロキシアルケン酸をモノマーユニットとして含む、PHA であることが確認された。また、得られた PHA は、<sup>1</sup>H-NMR スペクトル積分比より、3-ヒドロキシ-5-[(フェニルメチル) オキシ] 吉草酸のモノマーユニットを 91.6 mol % 含むことがわかった。

【0108】

【実施例 4】

D-グルコース 0.5%、ポリペプトン 0.1%、5-[(フェニルメチル) オキシ] 吉草酸 0.1% とを含む M9 培地 200 mL に、シュードモナス・ジェッセニイ・P161 株を接種し、30℃、125 ストローク/分で振盪培養した。48 時間後、菌体を遠心分離により回収し、D-グルコース 0.5%、5-[(フェニルメチル) オキシ] 吉草酸 0.1% を含む M9 培地 200 mL に再懸濁して、更に、30℃、125 ストローク/分で振盪培養した。48 時間後、菌体を遠心分離により回収し、冷メタノールにて一度洗浄して凍結乾燥した。

【0109】

この凍結乾燥ペレットを 20 mL クロロホルムに懸濁し、60℃で 20 時間攪拌して PHA を抽出した。抽出液を孔径 0.45 μm のメンブランフィルターで濾過した後、ロータリーエバポレーターで濃縮し、濃縮液を冷メタノールで再沈殿させ、更に沈殿のみを回収して真空乾燥して PHA を 29 mg 得た。実施例 1 と同様の条件で NMR 分析を行った

(36)

JP 3880566 B2 2007.2.14

結果、得られたPHAは、化学式(26)で表される3-ヒドロキシ-5-[(フェニルメチル)オキシ]吉草酸のモノマーユニットを含み、且つ3-ヒドロキシ酪酸、3-ヒドロキシ吉草酸などの炭素数4から12までの飽和、不飽和脂肪酸である3-ヒドロキシアリカン酸または3-ヒドロキシアリケン酸をモノマーユニットとして含む、PHAであることが確認された。また、得られたPHAは、<sup>1</sup>H-NMRスペクトル積分比より、3-ヒドロキシ-5-[(フェニルメチル)オキシ]吉草酸のモノマーユニットを90.8mol%含むことがわかった。

【0110】

【実施例5】

D-グルコース0.5%、ポリペプトン0.1%、5-[(フェニルメチル)オキシ]吉草酸0.1%を含むM9培地200mLに、シュードモナス・チコリアイ・YN2株を接種し、30℃、125ストローク/分で振盪培養した。48時間後、D-グルコース5%、5-[(フェニルメチル)オキシ]吉草酸1%を含む水溶液20mLを添加して更に30℃、125ストローク/分で振盪培養した。48時間後、菌体を遠心分離により回収し、冷メタノールにて一度洗浄して凍結乾燥した。

【0111】

この凍結乾燥ペレットを20mLクロロホルムに懸濁し、60℃で20時間攪拌してPHAを抽出した。抽出液を孔径0.45μmのメンブランフィルターで濾過した後、ロータリーエバポレーターで濃縮し、濃縮液を冷メタノールで再沈殿させ、更に沈殿のみを回収して真空乾燥してPHAを25mg得た。実施例1と同様の条件でNMR分析を行った結果、得られたPHAは、化学式(26)で表される3-ヒドロキシ-5-[(フェニルメチル)オキシ]吉草酸のモノマーユニットを含み、且つ3-ヒドロキシ酪酸、3-ヒドロキシ吉草酸などの炭素数4から12までの飽和、不飽和脂肪酸である3-ヒドロキシアリカン酸または3-ヒドロキシアリケン酸をモノマーユニットとして含む、PHAであることが確認された。また、得られたPHAは、<sup>1</sup>H-NMRスペクトル積分比より、3-ヒドロキシ-5-[(フェニルメチル)オキシ]吉草酸のモノマーユニットを79.7mol%含むことがわかった。

【0112】

【実施例6】

ポリペプトン0.5%、5-[(フェニルメチル)オキシ]吉草酸0.1%を含むM9培地200mLに、シュードモナス・チコリアイ・YN2株を接種し、30℃、125ストローク/分で振盪培養した。48時間後、菌体を遠心分離により回収し、ピルビン酸0.5%、5-[(フェニルメチル)オキシ]吉草酸0.1%を含む、窒素源(NH<sub>4</sub>Cl)を含まないM9培地200mLに再懸濁して、更に、30℃、125ストローク/分で振盪培養した。48時間後、菌体を遠心分離により回収し、冷メタノールにて一度洗浄して凍結乾燥した。

【0113】

この凍結乾燥ペレットを20mLクロロホルムに懸濁し、60℃で20時間攪拌してPHAを抽出した。抽出液を孔径0.45μmのメンブランフィルターで濾過した後、ロータリーエバポレーターで濃縮し、濃縮液を冷メタノールで再沈殿させ、更に沈殿のみを回収して真空乾燥してPHAを24mg得た。実施例1と同様の条件でNMR分析を行った結果、得られたPHAは、化学式(26)で表される3-ヒドロキシ-5-[(フェニルメチル)オキシ]吉草酸のモノマーユニットを含み、且つ3-ヒドロキシ酪酸、3-ヒドロキシ吉草酸などの炭素数4から12までの飽和、不飽和脂肪酸である3-ヒドロキシアリカン酸または3-ヒドロキシアリケン酸をモノマーユニットとして含む、PHAであることが確認された。また、得られたPHAは、<sup>1</sup>H-NMRスペクトル積分比より、3-ヒドロキシ-5-[(フェニルメチル)オキシ]吉草酸のモノマーユニットを77.8mol%含むことがわかった。

【0114】

【実施例7】

(37)

JP 3880566 B2 2007.2.14

ポリペプトン0.5%、5-[(フェニルメチル)オキシ]吉草酸0.1%とを含むM9培地200mLに、シュードモナス・チコリアイ・YN2株を植菌し、30℃、125ストローク/分で振盪培養した。48時間後、菌体を遠心分離により回収し、冷メタノールにて一度洗浄して凍結乾燥した。

【0115】

この凍結乾燥ペレットを20mLクロロホルムに懸濁し、60℃で20時間攪拌してPHAを抽出した。抽出液を孔径0.45μmのメンブランフィルターで濾過した後、ロータリーエバポレーターで濃縮し、濃縮液を冷メタノールで再沈殿させ、更に沈殿のみを回収して真空乾燥してPHAを20mg得た。実施例1と同様の条件でNMR分析を行った結果、得られたPHAは、化学式(26)で表される3-ヒドロキシ-5-[(フェニルメチル)オキシ]吉草酸のモノマーユニットを含み、且つ3-ヒドロキシ酪酸、3-ヒドロキシ吉草酸などの炭素数4から12までの飽和、不飽和脂肪酸である3-ヒドロキシアリカン酸または3-ヒドロキシアリケン酸をモノマーユニットとして含む、PHAであることが確認された。また、得られたPHAは、<sup>1</sup>H-NMRスペクトル積分比より、3-ヒドロキシ-5-[(フェニルメチル)オキシ]吉草酸のモノマーユニットを74.2mol%含むことがわかった。

【0116】

【実施例8】

酵母エキス0.5%、5-[(フェニルメチル)オキシ]吉草酸0.1%とを含むM9培地200mLに、シュードモナス・チコリアイ・H45株を植菌し、30℃、125ストローク/分で振盪培養した。48時間後、菌体を遠心分離により回収し、冷メタノールにて一度洗浄して凍結乾燥した。

【0117】

この凍結乾燥ペレットを20mLクロロホルムに懸濁し、60℃で20時間攪拌してPHAを抽出した。抽出液を孔径0.45μmのメンブランフィルターで濾過した後、ロータリーエバポレーターで濃縮し、濃縮液を冷メタノールで再沈殿させ、更に沈殿のみを回収して真空乾燥してPHAを16mg得た。実施例1と同様の条件でNMR分析を行った結果、得られたPHAは、化学式(26)で表される3-ヒドロキシ-5-[(フェニルメチル)オキシ]吉草酸のモノマーユニットを含み、且つ3-ヒドロキシ酪酸、3-ヒドロキシ吉草酸などの炭素数4から12までの飽和、不飽和脂肪酸である3-ヒドロキシアリカン酸または3-ヒドロキシアリケン酸をモノマーユニットとして含む、PHAであることが確認された。また、得られたPHAは、<sup>1</sup>H-NMRスペクトル積分比より、3-ヒドロキシ-5-[(フェニルメチル)オキシ]吉草酸のモノマーユニットを75.9mol%含むことがわかった。

【0118】

【実施例9】

グルコース0.5%、5-[(フェニルメチル)オキシ]吉草酸0.1%とを含むM9培地200mLに、シュードモナス・ジェッセニイ・P161株を植菌し、30℃、125ストローク/分で振盪培養した。48時間後、菌体を遠心分離により回収し、冷メタノールにて一度洗浄して凍結乾燥した。

【0119】

この凍結乾燥ペレットを20mLクロロホルムに懸濁し、60℃で20時間攪拌してPHAを抽出した。抽出液を孔径0.45μmのメンブランフィルターで濾過した後、ロータリーエバポレーターで濃縮し、濃縮液を冷メタノールで再沈殿させ、更に沈殿のみを回収して真空乾燥してPHAを17mg得た。実施例1と同様の条件でNMR分析を行った結果、得られたPHAは、化学式(26)で表される3-ヒドロキシ-5-[(フェニルメチル)オキシ]吉草酸のモノマーユニットを含み、且つ3-ヒドロキシ酪酸、3-ヒドロキシ吉草酸などの炭素数4から12までの飽和、不飽和脂肪酸である3-ヒドロキシアリカン酸または3-ヒドロキシアリケン酸をモノマーユニットとして含む、PHAであることが確認された。また、得られたPHAは、<sup>1</sup>H-NMRスペクトル積分比より、3-

(38)

JP 3880566 B2 2007.2.14

ヒドロキシ-5-[(フェニルメチル)オキシ]吉草酸のモノマーユニットを81.5m  
o1%含むことがわかった。

【0120】

【実施例10】

ビルビン酸0.5%、5-[(フェニルメチル)オキシ]吉草酸0.1%とを含むM9  
培地200mLに、シュードモナス・チコリアイ・YN2株を接種し、30℃、125ス  
トローク/分で振盪培養した。48時間後、菌体を遠心分離により回収し、冷メタノール  
にて一度洗浄して凍結乾燥した。

【0121】

この凍結乾燥ペレットを20mLクロロホルムに懸濁し、60℃で20時間攪拌してP  
HAを抽出した。抽出液を孔径0.45μmのメンブランフィルターで濾過した後、ロー  
タリーエバポレーターで濃縮し、濃縮液を冷メタノールで再沈殿させ、更に沈殿のみを回  
収して真空乾燥してPHAを10mg得た。実施例1と同様の条件でNMR分析を行った  
結果、得られたPHAは、化学式(26)で表される3-ヒドロキシ-5-[(フェニル  
メチル)オキシ]吉草酸のモノマーユニットを含み、且つ3-ヒドロキシ酪酸、3-ヒド  
ロキシ吉草酸などの炭素数4から12までの飽和、不飽和脂肪酸である3-ヒドロキシアル  
カン酸または3-ヒドロキシアルケン酸をモノマーユニットとして含む、PHAである  
ことが確認された。また、得られたPHAは、<sup>1</sup>H-NMRスペクトル積分比より、3-  
ヒドロキシ-5-[(フェニルメチル)オキシ]吉草酸のモノマーユニットを88.5m  
o1%含むことがわかった。

【0122】

【実施例11】

グルタミン酸ナトリウム0.5%、5-[(フェニルメチル)オキシ]吉草酸0.1%  
とを含むM9培地200mLに、シュードモナス・チコリアイ・H45株を接種し、30  
℃、125ストローク/分で振盪培養した。48時間後、菌体を遠心分離により回収し、  
冷メタノールにて一度洗浄して凍結乾燥した。

【0123】

この凍結乾燥ペレットを20mLクロロホルムに懸濁し、60℃で20時間攪拌してP  
HAを抽出した。抽出液を孔径0.45μmのメンブランフィルターで濾過した後、ロー  
タリーエバポレーターで濃縮し、濃縮液を冷メタノールで再沈殿させ、更に沈殿のみを回  
収して真空乾燥してPHAを12mg得た。実施例1と同様の条件でNMR分析を行った  
結果、得られたPHAは、化学式(26)で表される3-ヒドロキシ-5-[(フェニル  
メチル)オキシ]吉草酸のモノマーユニットを含み、且つ3-ヒドロキシ酪酸、3-ヒド  
ロキシ吉草酸などの炭素数4から12までの飽和、不飽和脂肪酸である3-ヒドロキシアル  
カン酸または3-ヒドロキシアルケン酸をモノマーユニットとして含む、PHAである  
ことが確認された。また、得られたPHAは、<sup>1</sup>H-NMRスペクトル積分比より、3-  
ヒドロキシ-5-[(フェニルメチル)オキシ]吉草酸のモノマーユニットを86.3m  
o1%含むことがわかった。

【0124】

【実施例12】

ノナン酸0.1%、5-[(フェニルメチル)オキシ]吉草酸0.1%とを含むM9培  
地200mLに、シュードモナス・ジェッセニイ・P161株を接種し、30℃、125  
ストローク/分で振盪培養した。48時間後、菌体を遠心分離により回収し、冷メタノール  
にて一度洗浄して凍結乾燥した。

【0125】

この凍結乾燥ペレットを20mLクロロホルムに懸濁し、60℃で20時間攪拌してP  
HAを抽出した。抽出液を孔径0.45μmのメンブランフィルターで濾過した後、ロー  
タリーエバポレーターで濃縮し、濃縮液を冷メタノールで再沈殿させ、更に沈殿のみを回  
収して真空乾燥してPHAを9mg得た。実施例1と同様の条件でNMR分析を行った結  
果、得られたPHAは、化学式(26)で表される3-ヒドロキシ-5-[(フェニルメ

(39)

JP 3880566 B2 2007.2.14

チル) オキシ] 吉草酸のモノマーユニットを含み、且つそれ以外のモノマーユニットが3-ヒドロキシ酪酸、3-ヒドロキシ古草酸などの炭素数4から12までの飽和、不飽和脂肪酸である3-ヒドロキシアルカン酸または3-ヒドロキシアルケン酸をモノマーユニットとして含む、PHAであることが確認された。また、得られたPHAは、<sup>1</sup>H-NMRスペクトル積分比より、3-ヒドロキシ-5-[(フェニルメチル) オキシ] 吉草酸のモノマーユニットを24.5mol%含むことがわかった。

【0126】

【実施例13】

D-グルコース0.5%、ポリペプトン0.1%、4-[(フェニルメチル) オキシ] 酪酸0.1%とを含むM9培地200mLに、シュードモナス・チコリアイ・YN2株を植菌し、30℃、125ストローク/分で振盪培養した。48時間後、菌体を遠心分離により回収し、D-グルコース0.5%、4-[(フェニルメチル) オキシ] 酪酸0.1%を含むM9培地200mLに再懸濁して、更に、30℃、125ストローク/分で振盪培養した。48時間後、菌体を遠心分離により回収し、冷メタノールにて一度洗浄して凍結乾燥した。

【0127】

この凍結乾燥ペレットを20mLクロロホルムに懸濁し、60℃で20時間攪拌してPHAを抽出した。抽出液を孔径0.45μmのメンブランフィルターで濾過した後、ロータリーエバポレーターで濃縮し、濃縮液を冷メタノールで再沈殿させ、更に沈殿のみを回収して真空乾燥してPHAを30mg得た。実施例1と同様の条件でNMR分析を行った結果、得られたPHAは、3-ヒドロキシ-4-[(フェニルメチル) オキシ] 酪酸のモノマーユニットを含み、且つ3-ヒドロキシ酪酸、3-ヒドロキシ古草酸などの炭素数4から12までの飽和、不飽和脂肪酸である3-ヒドロキシアルカン酸または3-ヒドロキシアルケン酸をモノマーユニットとして含むPHAであることが確認された。また、得られたPHAは、<sup>1</sup>H-NMRスペクトル積分比より、3-ヒドロキシ-4-[(フェニルメチル) オキシ] 酪酸のモノマーユニットを92.4mol%含むことがわかった。

【0128】

また、得られたPHAの分子量をゲルパーミエーションクロマトグラフィー(GPC; 東ソーHLC-8220、カラム: 東ソーTSK-GEL Super HM-H、溶媒: クロロホルム、ポリスチレン換算)により評価した結果、 $M_n = 138000$ 、 $M_w = 294000$ であった。

【0129】

【実施例14】

D-グルコース0.5%、4-[(フェニルメチル) オキシ] 酪酸0.1%とを含むM9培地200mLに、シュードモナス・チコリアイ・YN2株を植菌し、30℃、125ストローク/分で振盪培養した。48時間後、菌体を遠心分離により回収し、D-グルコース0.5%、4-[(フェニルメチル) オキシ] 酪酸0.1%を含む、窒素源(NH<sub>4</sub>Cl)を含まないM9培地200mLに再懸濁して、更に、30℃、125ストローク/分で振盪培養した。48時間後、菌体を遠心分離により回収し、冷メタノールにて一度洗浄して凍結乾燥した。

【0130】

この凍結乾燥ペレットを20mLクロロホルムに懸濁し、60℃で20時間攪拌してPHAを抽出した。抽出液を孔径0.45μmのメンブランフィルターで濾過した後、ロータリーエバポレーターで濃縮し、濃縮液を冷メタノールで再沈殿させ、更に沈殿のみを回収して真空乾燥してPHAを26mg得た。実施例1と同様の条件でNMR分析を行った結果、得られたPHAは、3-ヒドロキシ-4-[(フェニルメチル) オキシ] 酪酸をモノマーユニットとして含む、且つ3-ヒドロキシ酪酸、3-ヒドロキシ古草酸などの炭素数4から12までの飽和、不飽和脂肪酸である3-ヒドロキシアルカン酸または3-ヒドロキシアルケン酸をモノマーユニットとして含むPHAであることが確認された。また、得られたPHAは、<sup>1</sup>H-NMRスペクトル積分比より、3-ヒドロキシ-4-[(フェ

(40)

JP 3880566 B2 2007.2.14

ニルメチル) オキシ] 酪酸のモノマーユニットを90.5mol%含むことがわかった。

【0131】

【実施例15】

D-グルコース0.5%、ポリペプトン0.1%、4-[(フェニルメチル) オキシ] 酪酸0.1%とを含むM9培地200mLに、シュードモナス・チコリアイ・YN2株を植菌し、30℃、125ストローク/分で振盪培養した。48時間後、D-グルコース5%、4-[(フェニルメチル) オキシ] 酪酸1%を含む水溶液20mLを添加して更に30℃、125ストローク/分で振盪培養した。48時間後、菌体を遠心分離により回収し、冷メタノールにて一度洗浄して凍結乾燥した。

【0132】

この凍結乾燥ペレットを20mLクロロホルムに懸濁し、60℃で20時間攪拌してPHAを抽出した。抽出液を孔径0.45μmのメンブランフィルターで濾過した後、ロータリーエバポレーターで濃縮し、濃縮液を冷メタノールで再沈殿させ、更に沈殿のみを回収して真空乾燥してPHAを20mg得た。実施例1と同様の条件でNMR分析を行った結果、得られたPHAは、3-ヒドロキシ-4-[(フェニルメチル) オキシ] 酪酸のモノマーユニットを含み、且つ3-ヒドロキシ酪酸、3-ヒドロキシ吉草酸などの炭素数4から12までの飽和、不飽和脂肪酸である3-ヒドロキシアルカン酸または3-ヒドロキシアルケン酸をモノマーユニットとして含むPHAであることが確認された。また、得られたPHAは、<sup>1</sup>H-NMRスペクトル積分比より、3-ヒドロキシ-4-[(フェニルメチル) オキシ] 酪酸のモノマーユニットを76.8mol%含むことがわかった。

【0133】

【実施例16】

ポリペプトン0.5%、4-[(フェニルメチル) オキシ] 酪酸0.1%とを含むM9培地200mLに、シュードモナス・チコリアイ・YN2株を植菌し、30℃、125ストローク/分で振盪培養した。48時間後、菌体を遠心分離により回収し、ピルビン酸0.5%、4-[(フェニルメチル) オキシ] 酪酸0.1%を含む、窒素源(NH<sub>4</sub>Cl)を含まないM9培地200mLに再懸濁して、更に、30℃、125ストローク/分で振盪培養した。48時間後、菌体を遠心分離により回収し、冷メタノールにて一度洗浄して凍結乾燥した。

【0134】

この凍結乾燥ペレットを20mLクロロホルムに懸濁し、60℃で20時間攪拌してPHAを抽出した。抽出液を孔径0.45μmのメンブランフィルターで濾過した後、ロータリーエバポレーターで濃縮し、濃縮液を冷メタノールで再沈殿させ、更に沈殿のみを回収して真空乾燥してPHAを19mg得た。実施例1と同様の条件でNMR分析を行った結果、得られたPHAは、3-ヒドロキシ-4-[(フェニルメチル) オキシ] 酪酸のモノマーユニットを含み、且つ3-ヒドロキシ酪酸、3-ヒドロキシ吉草酸などの炭素数4から12までの飽和、不飽和脂肪酸である3-ヒドロキシアルカン酸または3-ヒドロキシアルケン酸をモノマーユニットとして含むPHAであることが確認された。また、得られたPHAは、<sup>1</sup>H-NMRスペクトル積分比より、3-ヒドロキシ-4-[(フェニルメチル) オキシ] 酪酸のモノマーユニットを73.2mol%含むことがわかった。

【0135】

【実施例17】

ポリペプトン0.5%、4-[(フェニルメチル) オキシ] 酪酸0.1%とを含むM9培地200mLに、シュードモナス・チコリアイ・YN2株を植菌し、30℃、125ストローク/分で振盪培養した。48時間後、菌体を遠心分離により回収し、冷メタノールにて一度洗浄して凍結乾燥した。

【0136】

この凍結乾燥ペレットを20mLクロロホルムに懸濁し、60℃で20時間攪拌してPHAを抽出した。抽出液を孔径0.45μmのメンブランフィルターで濾過した後、ロータリーエバポレーターで濃縮し、濃縮液を冷メタノールで再沈殿させ、更に沈殿のみを回

(41)

JP 3880566 B2 2007.2.14

収して真空乾燥してPHAを15mg得た。実施例1と同様の条件でNMR分析を行った結果、得られたPHAは、3-ヒドロキシ-4-[(フェニルメチル)オキシ]酪酸のモノマーユニットを含み、且つ3-ヒドロキシ酪酸、3-ヒドロキシ吉草酸などの炭素数4から12までの飽和、不飽和脂肪酸である3-ヒドロキシアルカン酸または3-ヒドロキシアルケン酸をモノマーユニットとして含むPHAであることが確認された。また、得られたPHAは、<sup>1</sup>H-NMRスペクトル積分比より、3-ヒドロキシ-4-[(フェニルメチル)オキシ]酪酸のモノマーユニットを76.7mol%含むことがわかった。

【0137】

【実施例18】

酵母エキス0.5%、4-[(フェニルメチル)オキシ]酪酸0.1%とを含むM9培地200mLに、シュードモナス・チコリアイ・H45株を接種し、30℃、125ストローク/分で振盪培養した。48時間後、菌体を遠心分離により回収し、冷メタノールにて一度洗浄して凍結乾燥した。

【0138】

この凍結乾燥ペレットを20mLクロロホルムに懸濁し、60℃で20時間攪拌してPHAを抽出した。抽出液を孔径0.45μmのメンブランフィルターで濾過した後、ロータリーエバポレーターで濃縮し、濃縮液を冷メタノールで再沈殿させ、更に沈殿のみを回収して真空乾燥してPHAを14mg得た。実施例1と同様の条件でNMR分析を行った結果、得られたPHAは、3-ヒドロキシ-4-[(フェニルメチル)オキシ]酪酸のモノマーユニットを含み、且つ3-ヒドロキシ酪酸、3-ヒドロキシ吉草酸などの炭素数4から12までの飽和、不飽和脂肪酸である3-ヒドロキシアルカン酸または3-ヒドロキシアルケン酸をモノマーユニットとして含むPHAであることが確認された。また、得られたPHAは、<sup>1</sup>H-NMRスペクトル積分比より、3-ヒドロキシ-4-[(フェニルメチル)オキシ]酪酸のモノマーユニットを75.5mol%含むことがわかった。

【0139】

【実施例19】

グルコース0.5%、4-[(フェニルメチル)オキシ]酪酸0.1%とを含むM9培地200mLに、シュードモナス・ジェッセニイ・P161株を接種し、30℃、125ストローク/分で振盪培養した。48時間後、菌体を遠心分離により回収し、冷メタノールにて一度洗浄して凍結乾燥した。

【0140】

この凍結乾燥ペレットを20mLクロロホルムに懸濁し、60℃で20時間攪拌してPHAを抽出した。抽出液を孔径0.45μmのメンブランフィルターで濾過した後、ロータリーエバポレーターで濃縮し、濃縮液を冷メタノールで再沈殿させ、更に沈殿のみを回収して真空乾燥してPHAを11mg得た。実施例1と同様の条件でNMR分析を行った結果、得られたPHAは、3-ヒドロキシ-4-[(フェニルメチル)オキシ]酪酸のモノマーユニットを含み、且つ3-ヒドロキシ酪酸、3-ヒドロキシ吉草酸などの炭素数4から12までの飽和、不飽和脂肪酸である3-ヒドロキシアルカン酸または3-ヒドロキシアルケン酸をモノマーユニットとして含むPHAであることが確認された。また、得られたPHAは、<sup>1</sup>H-NMRスペクトル積分比より、3-ヒドロキシ-4-[(フェニルメチル)オキシ]酪酸のモノマーユニットを85.9mol%含むことがわかった。

【0141】

【実施例20】

ビルビン酸0.5%、4-[(フェニルメチル)オキシ]酪酸0.1%とを含むM9培地200mLに、シュードモナス・チコリアイ・YN2株を接種し、30℃、125ストローク/分で振盪培養した。48時間後、菌体を遠心分離により回収し、冷メタノールにて一度洗浄して凍結乾燥した。

【0142】

この凍結乾燥ペレットを20mLクロロホルムに懸濁し、60℃で20時間攪拌してPHAを抽出した。抽出液を孔径0.45μmのメンブランフィルターで濾過した後、ロー

(42)

JP 3880566 B2 2007.2.14

タリーエバポレーターで濃縮し、濃縮液を冷メタノールで再沈殿させ、更に沈殿のみを回収して真空乾燥してPHAを8mg得た。実施例1と同様の条件でNMR分析を行った結果、得られたPHAは、3-ヒドロキシ-4-[(フェニルメチル)オキシ]酪酸のモノマーユニットを含み、且つ3-ヒドロキシ酪酸、3-ヒドロキシ吉草酸などの炭素数4から12までの飽和、不飽和脂肪酸である3-ヒドロキシアルカン酸または3-ヒドロキシアルケン酸をモノマーユニットとして含むPHAであることが確認された。また、得られたPHAは、<sup>1</sup>H-NMRスペクトル積分比より、3-ヒドロキシ-4-[(フェニルメチル)オキシ]酪酸のモノマーユニットを90.4mol%含むことがわかった。

【0143】

【実施例21】

グルタミン酸ナトリウム0.5%、4-[(フェニルメチル)オキシ]酪酸0.1%とを含むM9培地200mLに、シュードモナス・チコリアイ・H45株を植菌し、30℃、125ストローク/分で振盪培養した。48時間後、菌体を遠心分離により回収し、冷メタノールにて一度洗浄して凍結乾燥した。

【0144】

この凍結乾燥ペレットを20mLクロロホルムに懸濁し、60℃で20時間攪拌してPHAを抽出した。抽出液を孔径0.45μmのメンブランフィルターで濾過した後、ロータリーエバポレーターで濃縮し、濃縮液を冷メタノールで再沈殿させ、更に沈殿のみを回収して真空乾燥してPHAを10mg得た。実施例1と同様の条件でNMR分析を行った結果、得られたPHAは、3-ヒドロキシ-4-[(フェニルメチル)オキシ]酪酸のモノマーユニットを含み、且つ3-ヒドロキシ酪酸、3-ヒドロキシ吉草酸などの炭素数4から12までの飽和、不飽和脂肪酸である3-ヒドロキシアルカン酸または3-ヒドロキシアルケン酸をモノマーユニットとして含むPHAであることが確認された。また、得られたPHAは、<sup>1</sup>H-NMRスペクトル積分比より、3-ヒドロキシ-4-[(フェニルメチル)オキシ]酪酸のモノマーユニットを84.3mol%含むことがわかった。

【0145】

【実施例22】

ノナン酸0.1%、4-[(フェニルメチル)オキシ]酪酸0.1%とを含むM9培地200mLに、シュードモナス・ジェッセニイ・P161株を植菌し、30℃、125ストローク/分で振盪培養した。48時間後、菌体を遠心分離により回収し、冷メタノールにて一度洗浄して凍結乾燥した。

【0146】

この凍結乾燥ペレットを20mLクロロホルムに懸濁し、60℃で20時間攪拌してPHAを抽出した。抽出液を孔径0.45μmのメンブランフィルターで濾過した後、ロータリーエバポレーターで濃縮し、濃縮液を冷メタノールで再沈殿させ、更に沈殿のみを回収して真空乾燥してPHAを7mg得た。実施例1と同様の条件でNMR分析を行った結果、得られたPHAは、3-ヒドロキシ-4-[(フェニルメチル)オキシ]酪酸のモノマーユニットを含み、且つそれ以外のモノマーユニットが3-ヒドロキシ酪酸、3-ヒドロキシ吉草酸などの炭素数4から12までの飽和、不飽和脂肪酸である3-ヒドロキシアルカン酸または3-ヒドロキシアルケン酸をモノマーユニットとして含むPHAであることが確認された。また、得られたPHAは、<sup>1</sup>H-NMRスペクトル積分比より、3-ヒドロキシ-4-[(フェニルメチル)オキシ]酪酸のモノマーユニットを21.9mol%含むことがわかった。

【0147】

【実施例23】

0.5%のグルコース、6mMの5-フェノキシ吉草酸、及び3mMの5-[(フェニルメチル)オキシ]吉草酸を前記M9培地100mLに溶解し、200mL容振とうフラスコに入れてオートクレーブにより滅菌した後、室温まで冷却した。調製した培地中に、予め0.5%のポリペプトンを含むM9培地で30℃、8時間振とう培養したシュードモナス・チコリアイYN2株の培養液を2mL加え、30℃、48時間培養した。培養後、



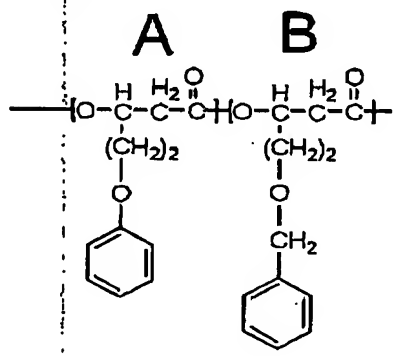
(43)

JP 3880566 B2 2007.2.14

遠心分離により菌体を回収し、その菌体を再び上記と同じ培地100mlに懸濁し、200ml容振とうフラスコで30℃、42時間培養した。培養後、遠心分離により菌体を回収し、メタノールで洗浄した後乾燥した。乾燥菌体を秤量後、クロロホルムを加え、35℃で72時間攪拌することによりポリマーを抽出した。ポリマーが抽出されたクロロホルムをろ過し、エバポレーターにより濃縮した後、冷メタノールで沈殿固化した部分を集め、減圧乾燥して、目的とするポリマーを得た。実施例1と同様の条件でNMR分析を行った結果を図2に示す。得られたPHAは、以下の化学式(27)にA及びBで示すユニットを含むポリヒドロキシアルカノエート共重合体(A:B:その他(3-ヒドロキシ酪酸、3-ヒドロキシ吉草酸などの炭素数4から12までの飽和、不飽和脂肪酸である3-ヒドロキシアルカン酸または3-ヒドロキシアルケン酸ユニット)=63:37:0)であることが確認された。また、 $^{13}\text{C}$ -NMR(〈測定機器〉FT-NMR:Bruker DPX400、共鳴周波数: $^{13}\text{C}$ =100MHz、測定核種: $^{13}\text{C}$ 、使用溶媒: $\text{CDCl}_3$ 、測定温度:室温)により測定を行ったところ、Bのユニット即ち3-ヒドロキシ-5-[(フェニルメチル)オキシ]吉草酸ユニットが含まれていることが確認された。

【0148】

【化48】



ポリマーの分子量は、ゲルパーミエーションクロマトグラフィー(GPC)により測定した(東ソーHLC-8220GPC、カラム:東ソーTSK-GEL Super HM-H、溶媒:クロロホルム、ポリスチレン換算)。

【0149】

また、得られたポリマーの重量(PDW)は0.17g/l、得られたポリマーの数平均分子量は93,000であった。

【0150】

【実施例24】

0.5%のグルコース、0.1%のポリペプトン、6mMの5-フェノキシ吉草酸、及び3mMの5-[(フェニルメチル)オキシ]吉草酸を前記M9培地100mlに溶解し、200ml容振とうフラスコに入れてオートクレーブにより滅菌した後、室温まで冷却した。調製した培地中に、予め0.5%のポリペプトンを含むM9培地で30℃、8時間振とう培養したシュドモナス・チコリアイYN2株の培養液を2ml加え、30℃、42時間培養した。培養後、遠心分離により菌体を回収し、メタノールで洗浄した後乾燥した。乾燥菌体を秤量後、クロロホルムを加え、35℃で72時間攪拌することによりポリマーを抽出した。ポリマーが抽出されたクロロホルムをろ過し、エバポレーターにより濃縮した後、冷メタノールで沈殿固化した部分を集め、減圧乾燥して、目的とするポリマーを得た。

【0151】

得られたポリマーの構造決定を、実施例1と同様に $^1\text{H}$ -NMRによって行ったところ、以下の化学式(27)にA及びBで示すユニットを含むポリヒドロキシアルカノエート共重合体(A:B:その他(3-ヒドロキシ酪酸、3-ヒドロキシ吉草酸などの炭素数4から12までの飽和、不飽和脂肪酸である3-ヒドロキシアルカン酸または3-ヒドロキ

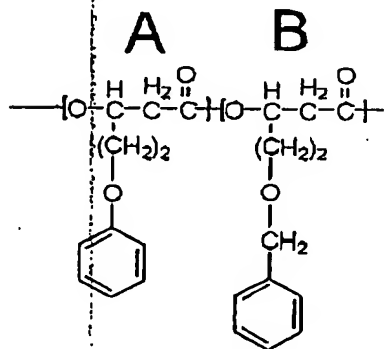
(44)

JP 3880566 B2 2007.2.14

シアルケン酸ユニット) = 38 : 33 : 29) であることが確認された。また、実施例 23 と同様に  $^{13}\text{C}$ -NMR 測定を行ったところ、B のユニット即ち 3-ヒドロキシ-5-[(フェニルメチル) オキシ] 吉草酸ユニットが含まれていることが確認された。

【0152】

【化49】



(27)

ポリマーの分子量は実施例 1 と同様に GPC により測定した。

【0153】

得られたポリマーの重量 (PDW) は 0.06 g / l、得られたポリマーの数平均分子量は 94,000 であった。

【0154】

【実施例 25】

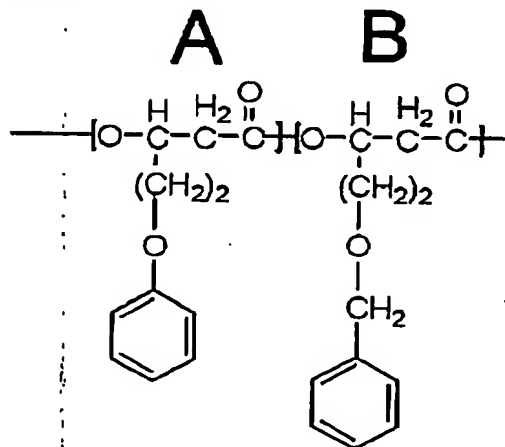
実施例 24 で用いた YN2 株をシュードモナスチコリアイ H45 株に、実施例 24 で用いたグルコース及びポリペプトンを 0.5% の酵母エキスに変更した以外は実施例 24 と同様の方法で、目的とするポリマーを得た。

【0155】

得られたポリマーの構造決定を、実施例 1 と同様に  $^1\text{H}$ -NMR によって行ったところ、以下の化学式 (27) に A 及び B で示すユニットを含むポリヒドロシアルカノエート共重合体 (A : B : その他 (3-ヒドロキシ酪酸、3-ヒドロキシ吉草酸などの炭素数 4 から 12 までの飽和、不飽和脂肪酸である 3-ヒドロシアルカン酸または 3-ヒドロシアルケン酸ユニット) = 42 : 33 : 25) であることが確認された。また、実施例 23 と同様に  $^{13}\text{C}$ -NMR 測定を行ったところ、B のユニット即ち 3-ヒドロキシ-5-[(フェニルメチル) オキシ] 吉草酸ユニットが含まれていることが確認された。

【0156】

【化50】



(27)

ポリマーの分子量は実施例 1 と同様に GPC により測定した。

(45)

JP 3880566 B2 2007.2.14

【0157】

得られたポリマーの重量 (PDW) は 0.05 g/l、得られたポリマーの数平均分子量は 91,000 であった。

【0158】

【実施例 26】

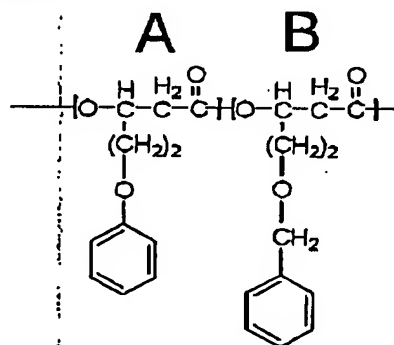
実施例 24 で用いた YN2 株をシュードモナスチコリアイ H45 株に、実施例 24 で用いたグルコース及びポリペプトンを 0.5% のビルビン酸ナトリウムに変更した以外は実施例 24 と同様の方法で、目的とするポリマーを得た。

【0159】

得られたポリマーの構造決定を、実施例 1 と同様に  $^1\text{H-NMR}$  によって行ったところ、以下の化学式 (27) に A 及び B で示すユニットを含むポリヒドロキシアлкаノエート共重合体 (A : B : その他 (3-ヒドロキシ酪酸、3-ヒドロキシ吉草酸などの炭素数 4 から 12 までの飽和、不飽和脂肪酸である 3-ヒドロキシアルカン酸または 3-ヒドロキシアルケン酸ユニット) = 58 : 24 : 18) であることが確認された。また、実施例 23 と同様に  $^{13}\text{C-NMR}$  測定を行ったところ、B のユニット即ち 3-ヒドロキシ-5-[(フェニルメチル)オキシ]吉草酸ユニットが含まれていることが確認された。

【0160】

【化 51】



ポリマーの分子量は、実施例 1 と同様に GPC により測定した。

【0161】

得られたポリマーの重量 (PDW) は 0.03 g/l、得られたポリマーの数平均分子量は 102,000 であった。

【0162】

【実施例 27】

実施例 24 で用いた YN2 株をシュードモナスジェッセニイ P161 株に、グルコース及びポリペプトンを 0.5% グルタミン酸ナトリウムに変更した以外は実施例 24 と同様の方法で、目的とするポリマーを得た。

【0163】

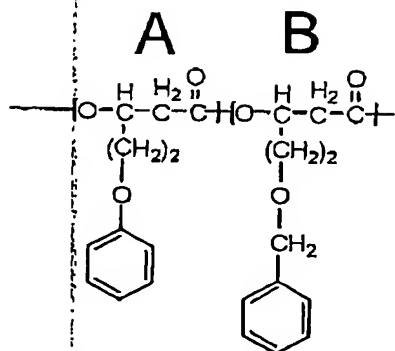
得られたポリマーの構造決定を、実施例 1 と同様に  $^1\text{H-NMR}$  によって行ったところ、以下の化学式 (27) に A 及び B で示すユニットを含むポリヒドロキシアлкаノエート共重合体 (A : B : その他 (3-ヒドロキシ酪酸、3-ヒドロキシ吉草酸などの炭素数 4 から 12 までの飽和、不飽和脂肪酸である 3-ヒドロキシアルカン酸または 3-ヒドロキシアルケン酸ユニット) = 40 : 35 : 25) であることが確認された。また、実施例 23 と同様に  $^{13}\text{C-NMR}$  測定を行ったところ、B のユニット即ち 3-ヒドロキシ-5-[(フェニルメチル)オキシ]吉草酸ユニットが含まれていることが確認された。

【0164】

(46)

JP 3880566 B2 2007.2.14

【化5:2】



10

ポリマーの分子量は、実施例 1 と同様に GPC により測定した。

【0165】

得られたポリマーの重量 (PDW) は 0.08 g/l、得られたポリマーの数平均分子量は 89,000 であった。

【0166】

【実施例 28】

実施例 24 で用いた YN2 株をシュードモナスジェッセニイ P161 株に、グルコース及びポリペプトンを 0.1% のノナン酸に変更した以外は実施例 24 と同様の方法で、目的とするポリマーを得た。

20

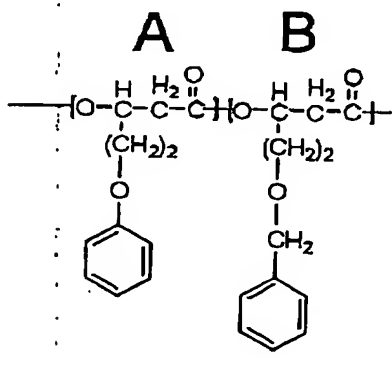
【0167】

得られたポリマーの構造決定を、実施例 1 と同様に  $^1\text{H-NMR}$  によって行ったところ、以下の化学式 (27) に A 及び B で示すユニットを含むポリヒドロキシアルカノエート共重合体 (A : B : その他 = 40 : 35 : 25) であることが確認された。また、実施例 23 と同様に  $^{13}\text{C-NMR}$  測定を行ったところ、B のユニット即ち 3-ヒドロキシ-5-[(フェニルメチル)オキシ]吉草酸ユニットが含まれていることが確認された。

【0168】

【化5:3】

30



40

ポリマーの分子量は、実施例 1 と同様に GPC により測定した。

【0169】

得られたポリマーの重量 (PDW) は 0.04 g/l、得られたポリマーの数平均分子量は 98,000 であった。

【0170】

【実施例 29】

実施例 24 で用いた 5-フェノキシ吉草酸を 4-フェノキシ酪酸に変更した以外は実施例 24 と同様の方法で目的とするポリマーを得た。

50

(47)

JP 3880566 B2 2007.2.14

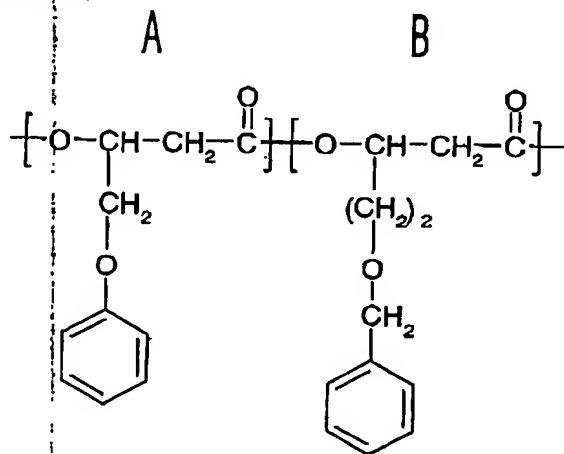
【0171】

得られたポリマーの構造決定を、実施例1と同様に<sup>1</sup>H-NMRによって行ったところ、以下の化学式(28)にA及びBで示すユニットを含むポリヒドロキシアлкаノエート共重合体(A:B:その他(3-ヒドロキシ酪酸、3-ヒドロキシ吉草酸などの炭素数4から12までの飽和、不飽和脂肪酸である3-ヒドロキシアルカン酸または3-ヒドロキシアルケン酸ユニット)=21:43:36)であることが確認された。また、実施例23と同様に<sup>13</sup>C-NMR測定を行ったところ、Bのユニット即ち3-ヒドロキシ-5-[(フェニルメチル)オキシ]吉草酸ユニットが含まれていることが確認された。

【0172】

【化54】

10



20

(28)

ポリマーの分子量は実施例1と同様にGPCにより測定した。  
得られたポリマーの重量(PDW)は0.02g/l、得られたポリマーの数平均分子量は92,000であった。

【0173】

【実施例30】

30

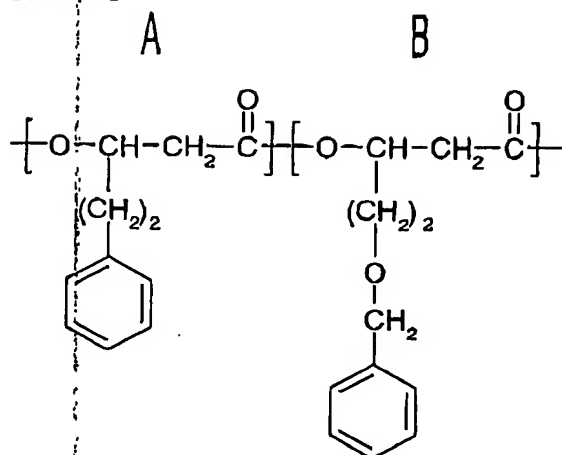
実施例24で用いた5-フェノキシ吉草酸を5-フェニル吉草酸に変更した以外は実施例24と同様の方法で目的とするポリマーを得た。  
得られたポリマーの構造決定を、実施例1と同様に<sup>1</sup>H-NMRによって行ったところ、以下の化学式(29)にA及びBで示すユニットを含むポリヒドロキシアлкаノエート共重合体(A:B:その他(3-ヒドロキシ酪酸、3-ヒドロキシ吉草酸などの炭素数4から12までの飽和、不飽和脂肪酸である3-ヒドロキシアルカン酸または3-ヒドロキシアルケン酸ユニット)=56:25:19)であることが確認された。

【0174】

(48)

JP 3880566 B2 2007.2.14

【化55】



(29)

ポリマーの分子量は実施例1と同様にGPCにより測定した。

【0175】

得られたポリマーの重量(PDW)は0.13g/l、得られたポリマーの数平均分子量は98,000であった。

【0176】

【実施例31】

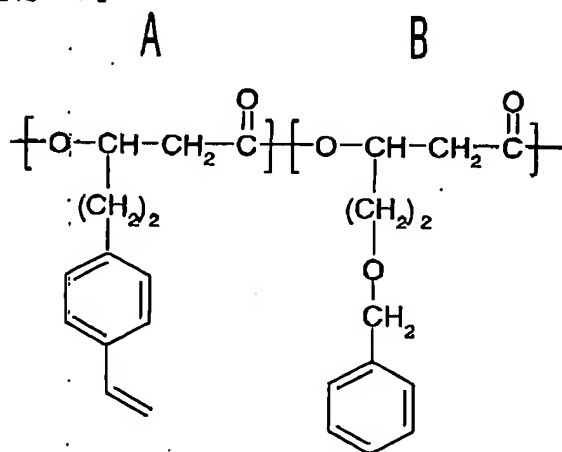
実施例24で用いた5-フェノキシ吉草酸を5-(4-ビニルフェニル)吉草酸に変更した以外は実施例24と同様の方法で目的とするポリマーを得た。

【0177】

得られたポリマーの構造決定を、実施例1と同様に<sup>1</sup>H-NMRによって行ったところ、以下の化学式(30)にA及びBで示すユニットを含むポリヒドロキシアリカノエート共重合体(A:B:その他(3-ヒドロキシ酪酸、3-ヒドロキシ吉草酸などの炭素数4から12までの飽和、不飽和脂肪酸である3-ヒドロキシアリカン酸または3-ヒドロキシアリケン酸ユニット)=42:34:24)であることが確認された。

【0178】

【化56】



(30)

ポリマーの分子量は実施例1と同様にGPCにより測定した。

【0179】

得られたポリマーの重量(PDW)は0.03g/l、得られたポリマーの数平均分子

10

20

30

40

50

(49)

JP 3880566 B2 2007.2.14

量は87.000であった。

【0180】

【実施例32】

実施例24で用いた5-フェノキシ吉草酸を5-ベンゾイル吉草酸に変更した以外は実施例24と同様の方法で目的とするポリマーを得た。

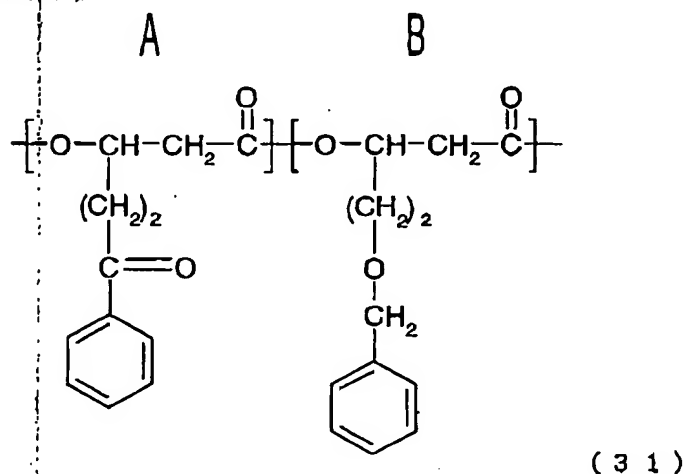
【0181】

得られたポリマーの構造決定を、実施例1と同様に<sup>1</sup>H-NMRによって行ったところ、以下の化学式(31)にA及びBで示すユニットを含むポリヒドロキシアルカノエート共重合体(A:B:その他(3-ヒドロキシ酪酸、3-ヒドロキシ吉草酸などの炭素数4から12までの飽和、不飽和脂肪酸である3-ヒドロキシアルカン酸または3-ヒドロキシアルケン酸ユニット)=48:27:25)であることが確認された。

10

【0182】

【化57】



20

ポリマーの分子量は実施例1と同様にGPCにより測定した。

【0183】

得られたポリマーの重量(PDW)は0.02g/l、得られたポリマーの数平均分子量は160,000であった。

30

【0184】

【実施例33】

実施例24で用いた5-フェノキシ吉草酸を5-(フェニルスルファニル)吉草酸に変更した以外は実施例24と同様の方法で目的とするポリマーを得た。

【0185】

得られたポリマーの構造決定を、実施例1と同様に<sup>1</sup>H-NMRによって行ったところ、以下の化学式(32)にA及びBで示すユニットを含むポリヒドロキシアルカノエート共重合体(A:B:その他(3-ヒドロキシ酪酸、3-ヒドロキシ吉草酸などの炭素数4から12までの飽和、不飽和脂肪酸である3-ヒドロキシアルカン酸または3-ヒドロキシアルケン酸ユニット)=56:22:22)であることが確認された。

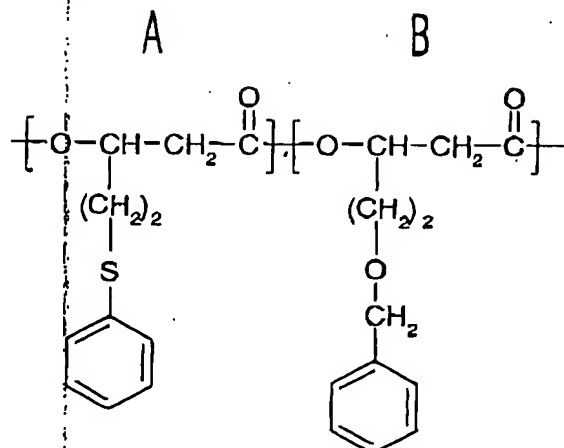
40

【0186】

(50)

JP 3880566 B2 2007.2.14

【化58】



(32)

ポリマーの分子量は実施例1と同様にGPCにより測定した。

【0187】

得られたポリマーの重量(PDW)は0.11 g/1、得られたポリマーの数平均分子量は89,000であった。

【0188】

【実施例34】

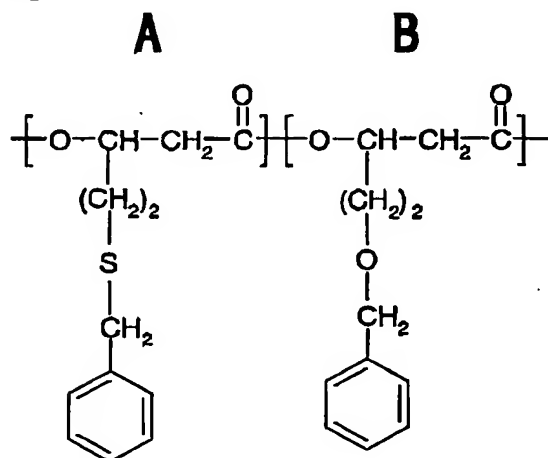
実施例24で用いた5-フェノキシ吉草酸を5-[(フェニルメチル)スルファニル]吉草酸に変更した以外は実施例24と同様の方法で目的とするポリマーを得た。

【0189】

得られたポリマーの構造決定を、実施例1と同様に<sup>1</sup>H-NMRによって行ったところ、以下の化学式(33)にA及びBで示すユニットを含むポリヒドロキシアルカノエート共重合体(A:B:その他(3-ヒドロキシ酪酸、3-ヒドロキシ吉草酸などの炭素数4から12までの飽和、不飽和脂肪酸である3-ヒドロキシアルカン酸または3-ヒドロキシアルケン酸ユニット)=46:31:24)であることが確認された。

【0190】

【化59】



(33)

ポリマーの分子量は実施例1と同様にGPCにより測定した。

【0191】

得られたポリマーの重量(PDW)は0.04 g/1、得られたポリマーの数平均分子

10

20

30

40

50



(51)

JP 3880566 B2 2007.2.14

量は 8.1, 000 であった。

【0192】

【実施例 35】

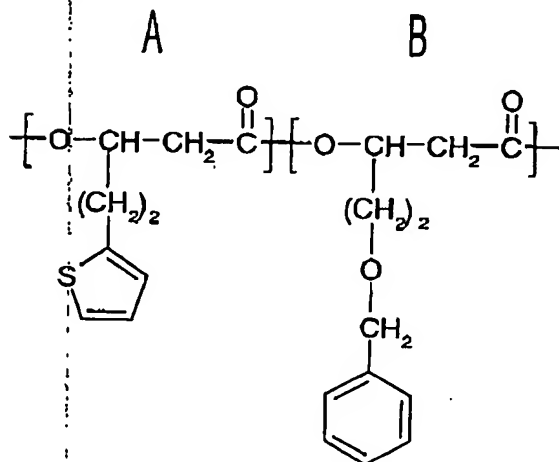
実施例 24 で用いた 5-フェノキシ吉草酸を 5-(2-チエニル)吉草酸に変更した以外は実施例 24 と同様の方法で目的とするポリマーを得た。

【0193】

得られたポリマーの構造決定を、実施例 1 と同様に  $^1\text{H-NMR}$  によって行ったところ、以下の化学式 (34) に A 及び B で示すユニットを含むポリヒドロキシルカーボネート共重合体 (A : B : その他 (3-ヒドロキシ酪酸、3-ヒドロキシ吉草酸などの炭素数 4 から 12 までの飽和、不飽和脂肪酸である 3-ヒドロキシルカーボン酸または 3-ヒドロキシルアルケン酸ユニット) = 51 : 26 : 23) であることが確認された。

【0194】

【化 60】



(34)

ポリマーの分子量は実施例 1 と同様に GPC により測定した。

【0195】

得られたポリマーの重量 (PDW) は 0.09 g / 1、得られたポリマーの数平均分子量は 86, 000 であった。

【0196】

【実施例 36】

実施例 24 で用いた 5-フェノキシ吉草酸を 5-(2-チエニルスルファニル)吉草酸に変更した以外は実施例 24 と同様の方法で目的とするポリマーを得た。

【0197】

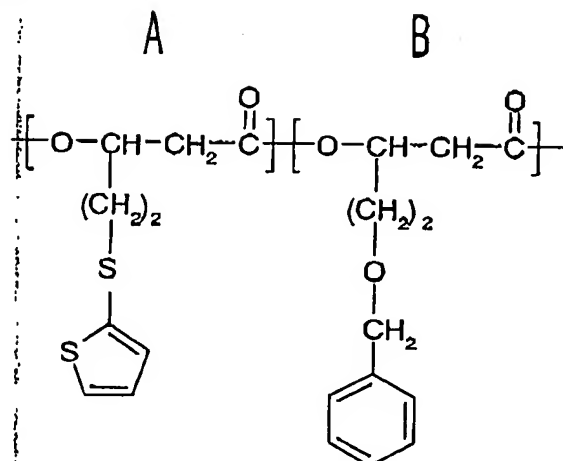
得られたポリマーの構造決定を、実施例 1 と同様に  $^1\text{H-NMR}$  によって行ったところ、以下の化学式 (35) に A 及び B で示すユニットを含むポリヒドロキシルカーボネート共重合体 (A : B : その他 (3-ヒドロキシ酪酸、3-ヒドロキシ吉草酸などの炭素数 4 から 12 までの飽和、不飽和脂肪酸である 3-ヒドロキシルカーボン酸または 3-ヒドロキシルアルケン酸ユニット) = 49 : 40 : 11) であることが確認された。

【0198】

(52)

JP 3880566 B2 2007.2.14

【化6:1】



(35)

ポリマーの分子量は実施例1と同様にGPCにより測定した。

【0199】

得られたポリマーの重量(PDW)は0.10g/l、得られたポリマーの数平均分子量は81,000であった。

【0200】

【実施例37】

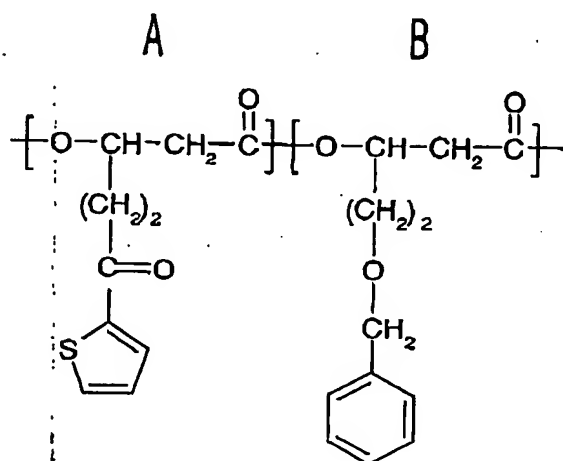
実施例24で用いた5-フェノキシ吉草酸を5-(2-チエニルカルボニル)吉草酸に変更した以外は実施例24と同様の方法で目的とするポリマーを得た。

【0201】

得られたポリマーの構造決定を、実施例1と同様に<sup>1</sup>H-NMRによって行ったところ、以下の化学式(36)にA及びBで示すユニットを含むポリヒドロキシアリカーノエート共重合体(A:B:その他(3-ヒドロキシ酪酸、3-ヒドロキシ吉草酸などの炭素数4から12までの飽和、不飽和脂肪酸である3-ヒドロキシアリカーン酸または3-ヒドロキシアリケン酸ユニット)=41:40:19)であることが確認された。

【0202】

【化6:2】



(36)

ポリマーの分子量は実施例1と同様にGPCにより測定した。

【0203】

得られたポリマーの重量(PDW)は0.02g/l、得られたポリマーの数平均分子

10

20

30

40

50

(53)

JP 3880566 B2 2007.2.14

量は 89,000 であった。

【0204】

【実施例 38】

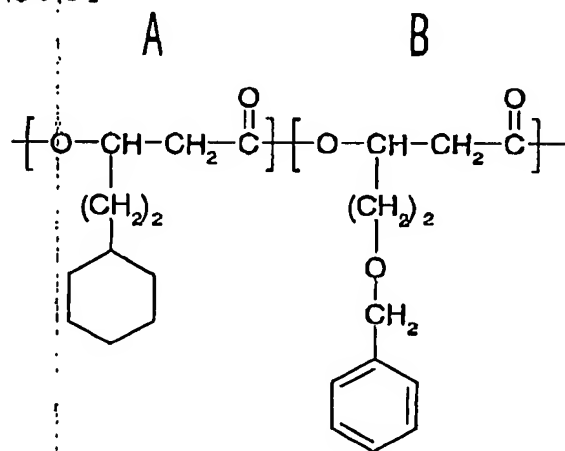
実施例 24 で用いた 5-フェノキシ吉草酸を 5-シクロヘキシル吉草酸に変更した以外は実施例 24 と同様の方法で目的とするポリマーを得た。

【0205】

得られたポリマーの構造決定を、実施例 1 と同様に  $^1\text{H-NMR}$  によって行ったところ、以下の化学式 (37) に A 及び B で示すユニットを含むポリヒドロキシアルカノエート共重合体 (A : B : その他 (3-ヒドロキシ酪酸、3-ヒドロキシ吉草酸などの炭素数 4 から 12 までの飽和、不飽和脂肪酸である 3-ヒドロキシアルカン酸または 3-ヒドロキシアルケン酸ユニット) = 46 : 28 : 26) であることが確認された。

【0206】

【化 63】



(37)

ポリマーの分子量は実施例 1 と同様に GPC により測定した。

【0207】

得られたポリマーの重量 (PDW) は 0.08 g / l、得られたポリマーの数平均分子量は 92,000 であった。

【0208】

【実施例 39】

実施例 24 で用いた 5-[(フェニルメチル)オキシ]吉草酸を 4-[(フェニルメチル)オキシ]酪酸に変更した以外は実施例 24 と同様の方法で目的とするポリマーを得た。

【0209】

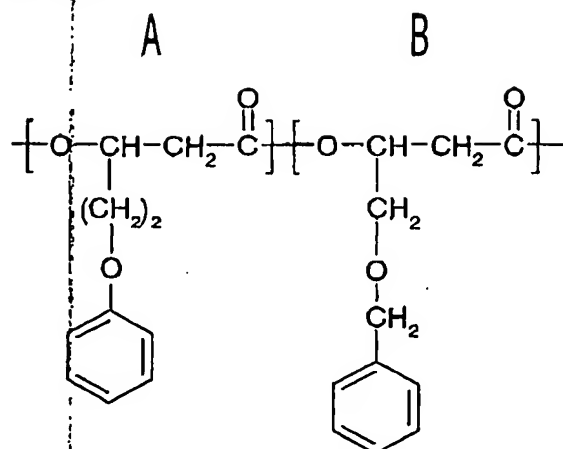
得られたポリマーの構造決定を、実施例 1 と同様に  $^1\text{H-NMR}$  によって行ったところ、以下の化学式 (38) に A 及び B で示すユニットを含むポリヒドロキシアルカノエート共重合体 (A : B : その他 (3-ヒドロキシ酪酸、3-ヒドロキシ吉草酸などの炭素数 4 から 12 までの飽和、不飽和脂肪酸である 3-ヒドロキシアルカン酸または 3-ヒドロキシアルケン酸ユニット) = 49 : 24 : 27) であることが確認された。また、実施例 23 と同様に  $^{13}\text{C-NMR}$  測定を行ったところ、B のユニット即ち 3-ヒドロキシ-4-[(フェニルメチル)オキシ]酪酸ユニットが含まれていることが確認された。

【0210】

(54)

JP 3880566 B2 2007.2.14

【化64】



(38)

ポリマーの分子量は実施例1と同様にGPCにより測定した。

【0211】

得られたポリマーの重量(PDW)は0.02g/l、得られたポリマーの数平均分子量は91,000であった。

【0212】

【実施例40】

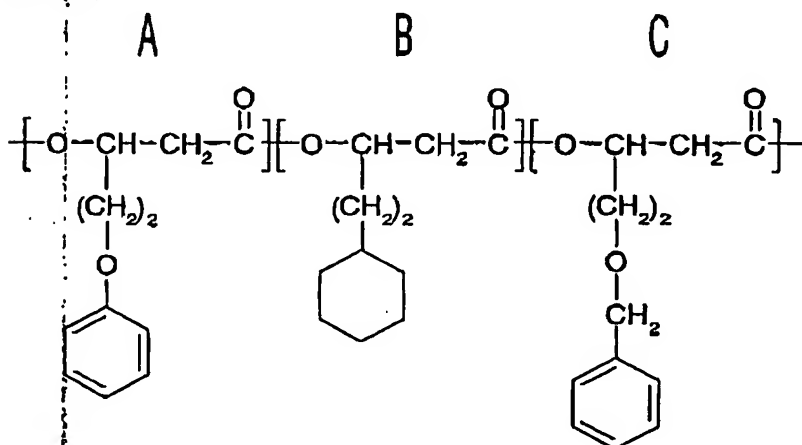
実施例24で用いた6mMの5-フェノキシ吉草酸を3mMの5-フェノキシ吉草酸と3mMの5-シクロヘキシル吉草酸に変更した以外は実施例24と同様の方法で目的とするポリマーを得た。

【0213】

得られたポリマーの構造決定を、実施例1と同様に<sup>1</sup>H-NMRによって行ったところ、以下の化学式(39)にA~Cで示すユニットを含むポリヒドロキシアルカノエート共重合体(A:B:C:その他(3-ヒドロキシ酪酸、3-ヒドロキシ吉草酸などの炭素数4から12までの飽和、不飽和脂肪酸である3-ヒドロキシアルカン酸または3-ヒドロキシアルケン酸ユニット)=31:28:21:20)であることが確認された。また、実施例23と同様に<sup>13</sup>C-NMR測定を行ったところ、Cのユニット即ち3-ヒドロキシ-5-[(フェニルメチル)オキシ]吉草酸ユニットが含まれていることが確認された。

【0214】

【化65】



(39)

50

(55)

JP 3880566 B2 2007.2.14

ポリマーの分子量は実施例 1 と同様に GPC により測定した。

【0215】

得られたポリマーの重量 (PDW) は 0.09 g/l、得られたポリマーの数平均分子量は 93,000 であった。

【図面の簡単な説明】

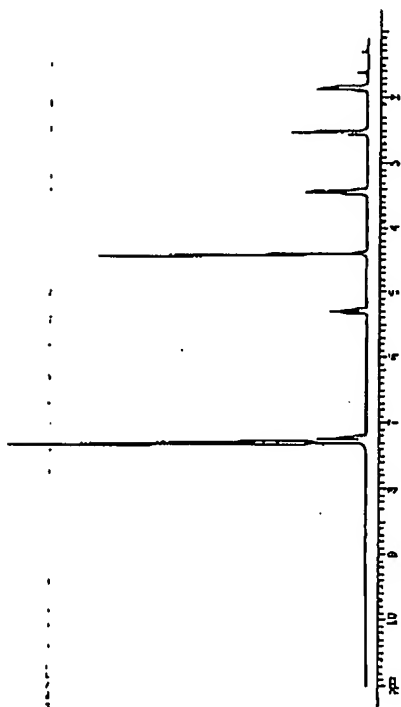
【0216】

【図 1】 実施例 1 におけるポリヒドロキシアルカノエートの  $^1\text{H}$ -NMR スペクトルチャートを示す。

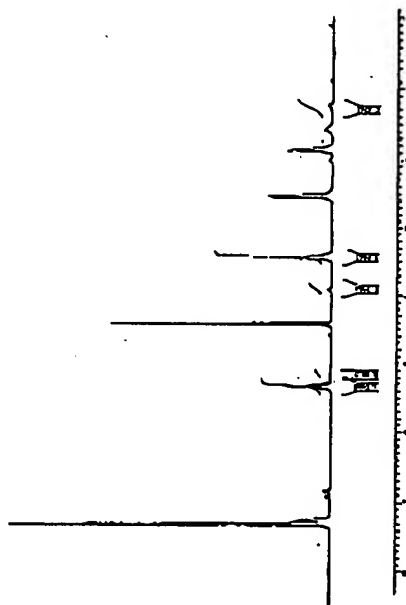
【図 2】 実施例 23 で取得されたポリエステル  $^1\text{H}$ -NMR スペクトルチャートを示す。

10

【図 1】



【図 2】



(56)

JP 3880566 B2 2007.2.14

---

フロントページの続き

(72)発明者 古崎 真也

東京都大田区下丸子3丁目30番2号 キヤノン株式会社内

(72)発明者 本間 務

東京都大田区下丸子3丁目30番2号 キヤノン株式会社内

(72)発明者 矢野 哲哉

東京都大田区下丸子3丁目30番2号 キヤノン株式会社内

審査官 宮本 純

(56)参考文献 特開2003-319792 (JP, A)

特開平07-031490 (JP, A)

特開平07-082352 (JP, A)

特開2000-072865 (JP, A)

特開2001-288256 (JP, A)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C08G 63/00-63/91

(TRANSLATION)

Docket No. 257100  
Dispatch No. 266136  
Date of Dispatch: June 21, 2006

**NOTIFICATION OF REASON FOR REFUSAL**

Patent Application No. 2003-356749  
Drawing Date: June 19, 2006  
Patent Office Examiner: MIYAMOTO, Jun 3041 4J00  
Agent for Applicant: Akio Miyazaki (and 3 others)  
Applied Articles: Articles 36 and 39 of the Patent Law

This application shall be rejected by the following reason(s). If the applicant has any opinions thereon, he/she is invited to file a written opinion within 60 days from the date of dispatch of this notification.

**REASON****Reason 1**

This application does not satisfy the requirements concerning the claims prescribed in Article 36, paragraph 6, item 2 of the Patent Law.

**Reason 2**

This application does not satisfy the requirements concerning the specification prescribed in Article 36, paragraph 4, item 1 of the Patent Law.

**Reason 3**

Since an invention of this application described in the following NOTE is identified with the invention in an application described in the following NOTE, the invention does not deserve a patent grant under Article 39, Paragraph 1 of the Patent Law.

**NOTE****As to Reason 1 (I)**

- In respect of claims 1-4

**Remarks**

While the above claims relate to an invention of an organic polymer compound itself, only a partial structure of the compound is specified in the claims but the whole structure of the compound is specified neither sufficiently nor concretely. (The chemical structure of repeating unit should be also specified.)

**As to Reason 1 (II)**

- In respect of claim 3

**Remarks**

In claim 3 there is a description "R comprises a residue having either a phenyl structure or a thienyl structure". Such a description as "phenyl structure" and "thienyl structure", however, does not enable the chemical structure of the R group to be grasped. Consequently, the compound of the invention of the claim is indefinite.

Since the invention of claim 3 is directed to a compound, the claim should

be described so as to specify the chemical structure of the compound (e.g. , using a structural formula and so forth).

As to Reason 2

Remarks

The description "-CH3-" in the A unit described in [0160] paragraph and [Chemical formula 59] of the present specification seems to be a typographical error for "-CH2-".

As to Reason 3

•In respect of claim 1

•reference 1

Remarks

The compound of claim 12 of reference 1, in which R1 is represented by formula (15), and the compound of the present invention in claim 1 of the present application are the same compound to each other.

Where this Reason is overcome, the Decision of Rejection will be issued, based on this still-pending application, reference 1.

#### LIST OF CITED REFERENCES

1. Japanese Patent Application No. 2003-036819 (Japanese Patent Application Laid-Open No. 2003-319792)

No reason for refusal is found for the present, in respect of the invention as defined in any other claim than those referred to in this notification. If any reason for refusal is newly found, the reason for refusal will be then notified.

#### RECORDS OF PRIOR ART SEARCH

-- Field of Search IPC 8th edition C08G63/00-63/91

-- Prior Art Documents

Japanese Patent Application Laid-Open No. 2000-072865

Japanese Patent Application Laid-Open No. 2001-288256

Japanese Patent Application Laid-Open No. H07-031490

Japanese Patent Application Laid-Open No. H07-082352

This records of prior art search do not constitute the reason of refusal.

Any inquiry concerning this notification or any request for interview should be directed to Jun MIYAMOTO, examiner, Patent Examining Section III, polymer:

TEL: 03-3581-1101 ext. 3455-3457

FAX: 03-3501-0698



整理番号:257100 発送番号:266136 発送日:平成18年 6月21日 1

## 拒絶理由通知書

特許出願の番号	特願2003-356749
起案日	平成18年 6月19日
特許庁審査官	宮本 純 3041 4J00
特許出願人代理人	宮崎 昭夫(外 3名) 様
適用条文	第36条、第39条

この出願は、次の理由によって拒絶をすべきものである。これについて意見があれば、この通知書の発送の日から60日以内に意見書を提出して下さい。

## 理 由

1. この出願は、特許請求の範囲の記載が下記の点で、特許法第36条第6項第2号に規定する要件を満たしていない。
2. この出願は、発明の詳細な説明の記載について下記の点で、特許法第36条第4項第1号に規定する要件を満たしていない。
3. この出願の下記の請求項に係る発明は、その出願日前の下記の出願に係る発明と同一であるから、特許法第39条第1項の規定により特許を受けることができない。

## 記

## 理由1 (I)

・請求項1～4

## 備考

上記請求項は有機高分子化合物自体の発明に関するが、該化合物の部分構造が特定されているのみであり、該化合物の全体の化学構造が十分具体的に特定されていない。(繰り返し単位の化学構造も併せて特定する必要がある。)

## 理由1 (II)

・請求項3

## 備考

請求項3には、「Rはフェニル構造或いはチエニル構造のいずれかの構造を有する残基を含んでいる」と記載されているが、「フェニル構造」、「チエニル構

整理番号:257100 送番号:266136 送日:平成18年 6月21日 2

造」等の記載では、R基が如何なる化学構造を有するのか把握することができないため、当該請求項に係る発明化合物は不明確である。

請求項3に係る発明は、化合物の発明であるので、請求項は化学構造が特定できるより（例えば化学構造式等を用いて）、記載しなければならない。

理由2

備考

本願発明の詳細な説明、【0190】【化59】に記載されるAユニット中「 $-\text{CH}_3-$ 」は、「 $-\text{CH}_2-$ 」の誤記であると認められる。

理由3

・請求項1

・出願1

備考

出願1の請求項12に係る発明化合物（ $\text{R}_1$ として式（15）のもの）と本願請求項1に係る発明化合物とは同一化合物である。

なお、本拒絶理由が解消しないときは、出願1が未確定であって拒絶査定を行うので留意されたい。

引用文献等一覧

1. 特願2003-036819号（特開2003-319792号公報）

この拒絶理由通知書中で指摘した請求項以外の請求項に係る発明については、現時点では、拒絶の理由を発見しない。拒絶の理由が新たに発見された場合には拒絶の理由が通知される。

#### 先行技術文献調査結果の記録

・調査した分野	IPC第8版 C08C63/00-63/91
・先行技術文献	特開2000-072865号公報
	特開2001-288256号公報
	特開平07-031490号公報
	特開平07-082352号公報

この先行技術文献調査結果の記録は、拒絶理由を構成するものではない。

この拒絶理由通知の内容に関するお問い合わせ、または面接のご希望がございましたら下記までご連絡ください。

整理番号:257100 発送番号:266136 発送日:平成18年 6月21日 3/E

特許審査第三部 高分子 宮本 純

TEL. 03(3581)1101 内線 3455-3457

FAX. 03(3501)0698

**Disclaimer:**

This English translation is produced by machine translation and may contain errors. The JPO, the INPIT, and those who drafted this document in the original language are not responsible for the result of the translation.

**Notes:**

1. Untranslatable words are replaced with asterisks (\*\*\*\*).
2. Texts in the figures are not translated and shown as it is.

Translated: 20:54:28 JST 09/25/2007

Dictionary: Last updated 09/07/2007 / Priority:

## Decision to Grant a Patent

Application number: Application for patent 2003-356749

Date of Drafting: Heisei 18(2006) October 12

Patent examiner: MIYAMOTO, Jun 3041 4J00

Title of invention: The new poly hydroxy alkanoate which contains in a side chain the unit which has OKISHI (phenylmethyl) structure, and its manufacture method

The number of claims: 17

Applicant: CANON KABUSHIKI KAISHA

Representative: MIYAZAKI, Teruo (and 3 others)

This application is to be granted a patent as there is no reason for refusal.

Director General(p.p.) Director(p.p.) Examiner Assistant examiner Manager for Determination of Classification HASHIMOTO, Shigekazu MIYAMOTO, Jun MAEDA, Takayasu 8620 3041 9456

1. Distinction of Patent: Usually
2. Reference documents: \*\*
3. Application of Patent Law, Section 30: Nothing
4. Change of Title of Invention: Nothing
5. International Patent Classification (IPC)  
C08G 63/06 ZBP , C12P 7/62 = C08L101/16 , (C12P 7/62 , C12R 1:38 )
6. Deposition of Microorganism
7. Display of Purport that Retroactivity of Filing Date is not Accepted

Decision to Grant a Patent(Memorandum)

Application number: Application for patent 2003-356749

1. Technical Fields to Be Searched (IPC, DB Name)

C08G 63/00-63/91

2. Reference patent documents

JP,2003-319792,A (JP, A) JP,07-031490,A (JP, A) JP,07-082352,A (JP, A) JP,2000-072865,A (JP, A) JP,2001-288256,A (JP, A)

3. Reference books and magazines

---

[Translation done.]

03500.017652

PATENT APPLICATION

## IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

In re Application of:	)	
TAKASHI KENMOKU ET AL.	)	Examiner: S.M. Hanley
Application No.: 10/531,572	)	Group Art Unit: 1651
Int'l Application No. PCT/JP03/13530	)	Confirmation No. 2325
Filed: October 23, 2003	)	
For: NEW	)	
POLYHYDROXYALKANOATE	)	
COMPRISING UNIT HAVING	)	
(PHENYLMETHYL)OXY	)	
STRUCTURE ON SIDE CHAIN	)	
THEREOF, AND METHOD FOR	)	
PRODUCING THE SAME	)	September 17, 2007

Commissioner for Patents  
P.O. Box 1450  
Alexandria, VA 22313-1450

PRELIMINARY AMENDMENT

Sir:

A. Introductory Comments

Prior to conducting the examination on the merits, please amend the above-captioned application as follows.

I hereby certify that this correspondence is being facsimile  
transmitted to the United States Patent and Trademark  
Office, Fax No. 1-571-273-0125 on

September 17, 2007

(Date of Facsimile Transmission)

Jason M. Okun

(Name of Attorney for Applicants)

Signature

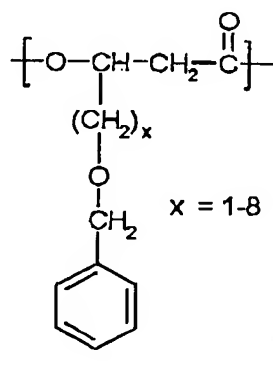
September 17, 2007  
Date of Signature

### B. Claims

The following is a complete listing of the claims, and replaces all earlier versions and listings.

1-20. (Cancelled)

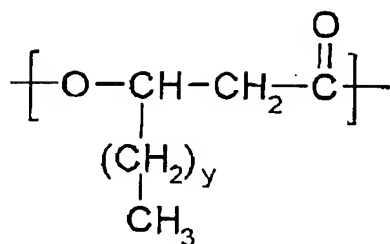
21. (New) A polyhydroxyalkanoate comprising a monomer unit of 3-hydroxy- $\omega$ -[(phenylmethyl)oxy]alkanoic acid expressed by chemical formula (1):



wherein x can be one or more integers within the range shown in the chemical formula.

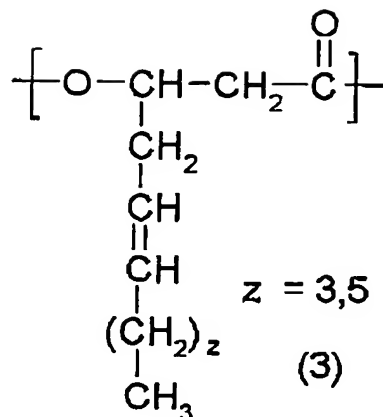
22. (New) The polyhydroxyalkanoate according to claim 21, comprising at least one unit expressed by chemical formula selected from the group consisting of chemical formulas (2) and (3):





$$y = 1-8$$

(2)

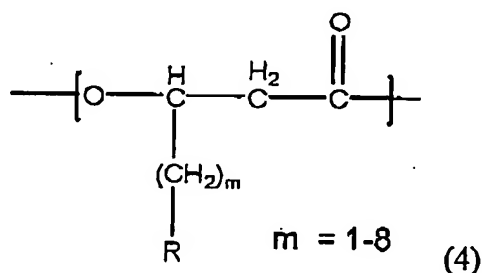


$$z = 3,5$$

(3)

wherein y and z can be one or more integers within the range shown in the chemical formulas, while being independent from the monomer unit expressed by chemical formula (1).

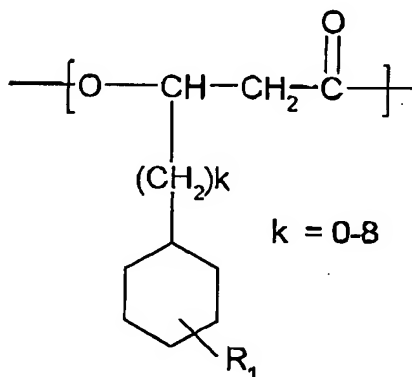
23. (New) The polyhydroxyalkanoate according to claim 21, comprising simultaneously, in at least a molecule thereof, the monomer of 3-hydroxy-ω-[(phenylmethyl)oxy]alkanoic acid expressed by chemical formula (1) and a unit expressed by chemical formula (4):



wherein m can be one or more integers within the range shown in the chemical formula, and R comprises a residue having either a phenyl structure or a thienyl

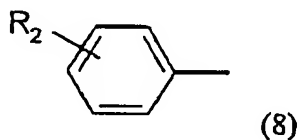
structure, or a 3-hydroxy- $\omega$ -cyclohexylalkanoic acid unit expressed by chemical formula

(5):

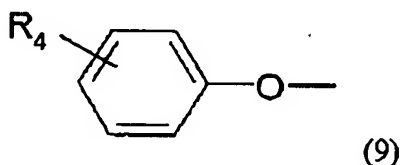


(5)

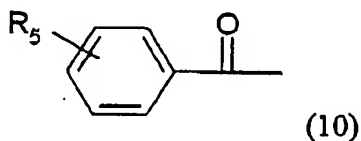
wherein  $R_1$  is H, CN,  $\text{NO}_2$ , halogen,  $\text{CH}_3$ ,  $\text{C}_2\text{H}_5$ ,  $\text{C}_3\text{H}_7$ ,  $\text{CF}_3$ ,  $\text{C}_2\text{F}_5$  and  $\text{C}_3\text{F}_7$ , and  $k$  can be one or more integers within the range shown in the chemical formula, wherein  $R$  in chemical formula (4), i.e. a residue having either a phenyl structure or a thienyl structure, is at least one group selected from the group consisting of residues



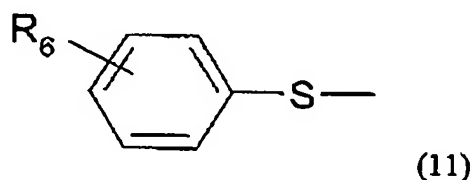
wherein  $R_2$  is H, halogen, CN,  $\text{NO}_2$ ,  $\text{CH}_3$ ,  $\text{C}_2\text{H}_5$ ,  $\text{C}_3\text{H}_7$ ,  $\text{CH}=\text{CH}_2$ ,  $\text{COOR}_3$  (wherein  $R_3$  represents any one selected from the group consisting of H, Na and K),  $\text{CF}_3$ ,  $\text{C}_2\text{F}_5$  and  $\text{C}_3\text{F}_7$ , and in a case where there exist a plurality of units,  $R_2$  may be different for each unit,



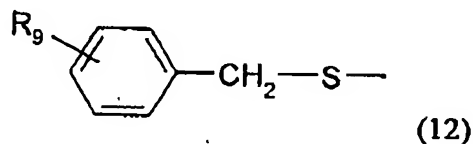
wherein  $R_4$  is selected from the group consisting of H, halogen, CN,  $\text{NO}_2$ ,  $\text{CH}_3$ ,  $\text{C}_2\text{H}_5$ ,  $\text{C}_3\text{H}_7$ ,  $\text{SCH}_3$ ,  $\text{CF}_3$ ,  $\text{C}_2\text{F}_5$  and  $\text{C}_3\text{F}_7$ , and in a case where there exist a plurality of units,  $R_4$  may be different for each unit;



wherein  $R_5$  is selected from the group consisting of H, halogen, CN,  $\text{NO}_2$ ,  $\text{CH}_3$ ,  $\text{C}_2\text{H}_5$ ,  $\text{C}_3\text{H}_7$ ,  $\text{CF}_3$ ,  $\text{C}_2\text{F}_5$  and  $\text{C}_3\text{F}_7$ , and in a case where there exist a plurality of units,  $R_5$  may be different for each unit;

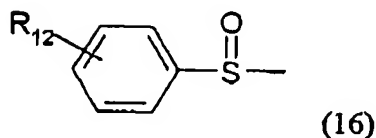
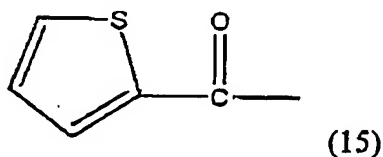
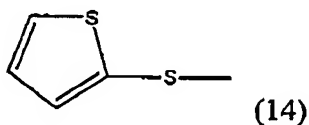
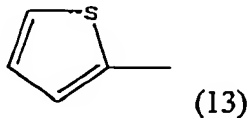


wherein  $R_6$  is selected from the group consisting of H, halogen, CN,  $\text{NO}_2$ ,  $\text{COOR}_7$ ,  $\text{SO}_2\text{R}_8$  (wherein  $R_7$  represents any one selected from the group consisting of H, Na, K,  $\text{CH}_3$  and  $\text{C}_2\text{H}_5$ , and  $R_8$  represents any one selected from the group consisting of OH, ONa, OK, halogen,  $\text{OCH}_3$  and  $\text{OC}_2\text{H}_5$ ),  $\text{CH}_3$ ,  $\text{C}_2\text{H}_5$ ,  $\text{C}_3\text{H}_7$ ,  $(\text{CH}_3)_2\text{-CH}$ , and  $(\text{CH}_3)_3\text{-C}$ , and in a case where there exist a plurality of units,  $R_6$  may be different for each unit;



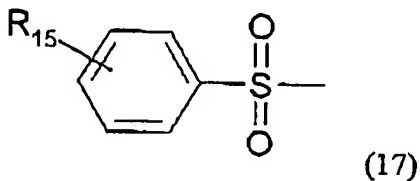
wherein  $R_9$  represents a substituent group on the aromatic ring,  $R_9$  is selected from the group consisting of H, halogen, CN,  $\text{NO}_2$ ,  $\text{COOR}_{10}$ ,  $\text{SO}_2\text{R}_{11}$  (wherein

$R_{10}$  represents any one selected from the group consisting of H, Na, K,  $\text{CH}_3$  and  $\text{C}_2\text{H}_5$ , and  $R_{11}$  represents any one selected from the group consisting of OH, ONa, OK, halogen,  $\text{OCH}_3$  and  $\text{OC}_2\text{H}_5$ ,  $\text{CH}_3$ ,  $\text{C}_2\text{H}_5$ ,  $\text{C}_3\text{H}_7$ ,  $(\text{CH}_3)_2\text{-CH}$  and  $(\text{CH}_3)_3\text{-C}$ , and in a case where there exist a plurality of units,  $R_9$  may be different for each unit;



wherein  $R_{12}$  is selected from the group consisting of H, halogen, CN,  $\text{NO}_2$ ,  $\text{COOR}_{13}$ ,  $\text{SO}_2\text{R}_{14}$  (wherein  $R_{13}$  represents any one selected from the group consisting of H, Na, K,  $\text{CH}_3$  and  $\text{C}_2\text{H}_5$ , and  $R_{14}$  represents any one selected from the group consisting of OH, ONa, OK, halogen,  $\text{OCH}_3$  and  $\text{OC}_2\text{H}_5$ ,  $\text{CH}_3$ ,  $\text{C}_2\text{H}_5$ ,  $\text{C}_3\text{H}_7$ ,  $(\text{CH}_3)_2\text{-CH}$  and  $(\text{CH}_3)_3\text{-C}$ ,

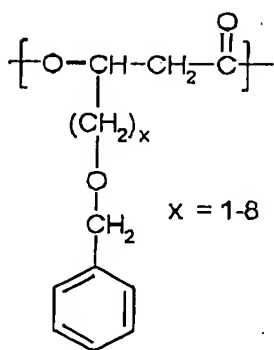
and in a case where there exist a plurality of units,  $R_{12}$  may be different for each unit; and



wherein  $R_{15}$  is selected from the group consisting of H, halogen, CN,  $\text{NO}_2$ ,  $\text{COOR}_{16}$ ,  $\text{SO}_2\text{R}_{17}$  (wherein  $R_{16}$  represents any one selected from the group consisting of H, Na, K,  $\text{CH}_3$  and  $\text{C}_2\text{H}_5$ , and  $R_{17}$  represents any one selected from the group consisting of OH, ONa, OK, halogen,  $\text{OCH}_3$  and  $\text{OC}_2\text{H}_5$ ),  $\text{CH}_3$ ,  $\text{C}_2\text{H}_5$ ,  $\text{C}_3\text{H}_7$ ,  $(\text{CH}_3)_2\text{-CH}$  and  $(\text{CH}_3)_3\text{-C}$ , and in a case where there exist a plurality of units,  $R_{15}$  may be different for each unit.

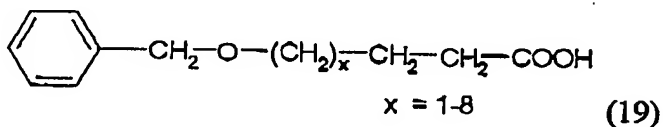
24. (New) The polyhydroxyalkanoate according to claim 21, wherein a number average molecular weight is within the range between 1000 and 1000000.

25. (New) A method for producing a polyhydroxyalkanoate comprising, in a molecule thereof, a monomer unit of 3-hydroxy- $\omega$ -[(phenylmethyl)oxy]alkanoic acid unit expressed by chemical formula (1):



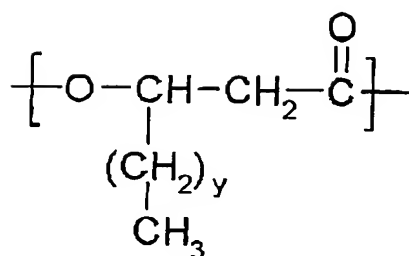
(1)

wherein x can be one or more integers within the range shown in the chemical formula, which comprises allowing a microorganism with an ability to produce a polyhydroxyalkanoate comprising in a molecule thereof the monomer unit of 3-hydroxy- $\omega$ -[(phenylmethyl)oxy]alkanoic acid expressed by chemical formula (1) to biosynthesize the polyhydroxyalkanoate from  $\omega$ -[(phenylmethyl)oxy]alkanoic acid expressed by chemical formula (19):



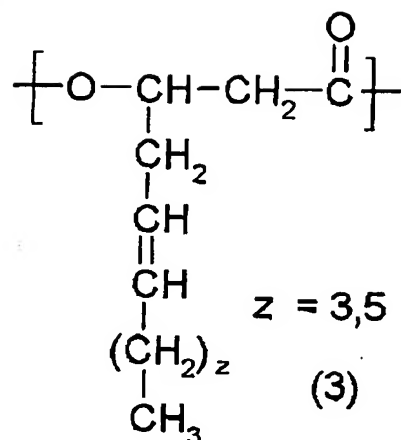
wherein x can be one or more integers within the range shown in the chemical formula as a raw material under a condition which comprises the  $\omega$ -[(phenylmethyl)oxy]alkanoic acid expressed by chemical formula (19).

26. (New) The method for producing a polyhydroxyalkanoate according to claim 25, wherein the polyhydroxyalkanoate comprises at least one unit expressed by the following chemical formulas (2) and (3):



$$y = 1-8$$

(2)

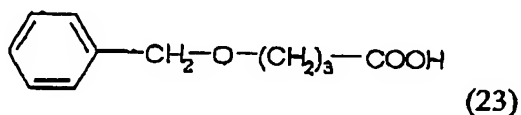


$$z = 3,5$$

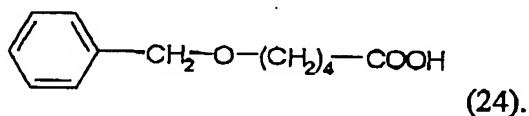
(3)

wherein y and z can be one or more integers within the range shown in the chemical formulas, while being independent from the unit expressed by chemical formula (1).

27. (New) The method for producing a polyhydroxyalkanoate according to claim 25, wherein the  $\omega$ -[(phenylmethyl)oxy]alkanoic acid expressed by said chemical formula (19) is 4-[(phenylmethyl)oxy]butyric acid expressed by chemical formula (23):

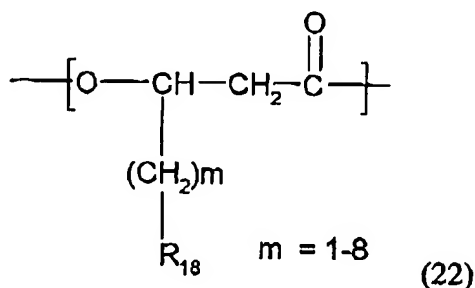


or 5-[(phenylmethyl)oxy]valeric acid expressed by chemical formula (24):

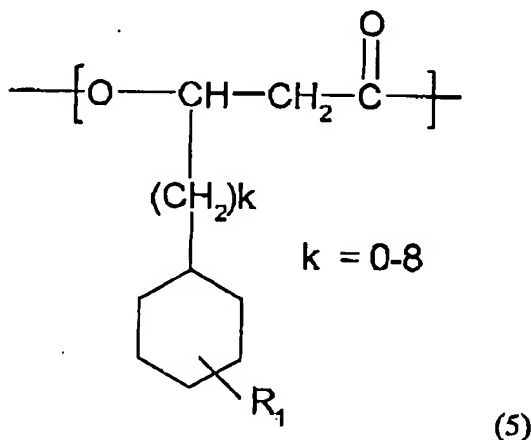


28. (New) The method for producing a polyhydroxyalkanoate according to claim 25, comprising allowing the microorganism with an ability to produce a polyhydroxyalkanoate comprising simultaneously, in at least a molecule thereof, the monomer unit of 3-hydroxy- $\omega$ -[(phenylmethyl)oxy]alkanoic acid expressed by chemical formula (1) and

a 3-hydroxy-alkanoic acid unit expressed by chemical formula (22):



wherein m can be one or more integers within the range shown in the chemical formula, and R<sub>18</sub> comprises a residue having either a phenyl structure or a thienyl structure; or 3-hydroxy- $\omega$ -cyclohexylalkanoic acid unit expressed by chemical formula (5):

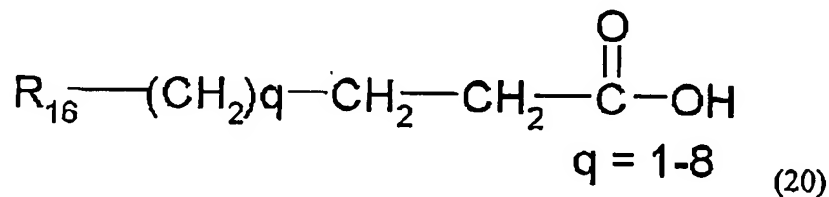


wherein R<sub>1</sub> is selected from the group consisting of H, CN, NO<sub>2</sub>, halogen,

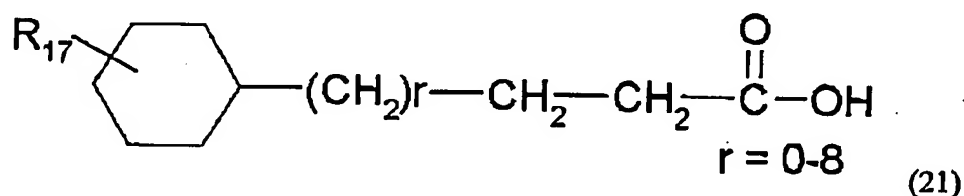


$\text{CH}_3$ ,  $\text{C}_2\text{H}_5$ ,  $\text{C}_3\text{H}_7$ ,  $\text{CF}_3$ ,  $\text{C}_2\text{F}_5$  and  $\text{C}_3\text{F}_7$ , and  $k$  can be one or more integers within the range shown in the chemical formula,

from  $\omega$ -[(phenylmethyl)oxy]alkanoic acid expressed by chemical formula (19), and a alkanoic acid expressed by chemical formula (20):

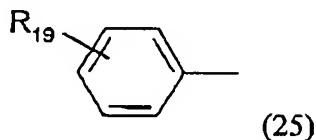


wherein  $q$  can be one or more integers within the range shown in the chemical formula, and  $\text{R}_{16}$  comprises a residue having either a phenyl structure or a thienyl structure, or  $\omega$ -cyclohexylalkanoic acid expressed by chemical formula (21) :

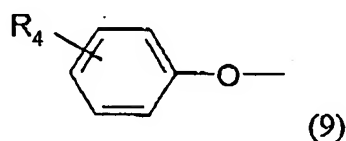


wherein  $\text{R}_{17}$  is selected from the group consisting of H, CN,  $\text{NO}_2$ , halogen,  $\text{CH}_3$ ,  $\text{C}_2\text{H}_5$ ,  $\text{C}_3\text{H}_7$ ,  $\text{CF}_3$ ,  $\text{C}_2\text{F}_5$  and  $\text{C}_3\text{F}_7$ , and  $r$  can be one or more integers within the range shown in the chemical formula as raw materials to biosynthesize the polyhydroxyalkanoate under a condition which comprise  $\omega$ -[(phenylmethyl)oxy]alkanoic acid expressed by chemical formula (19), and alkanoic acid expressed by chemical formula (20) or  $\omega$ -cyclohexylalkanoic acid expressed by chemical formula (21), wherein  $\text{R}_{16}$  in chemical formula (20) and  $\text{R}_{18}$  in chemical formula (22), i.e. residues having either a phenyl

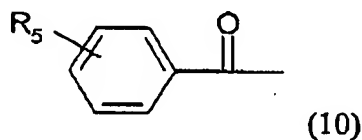
structure or a thienyl structure, are at least one group selected from the group consisting of residues



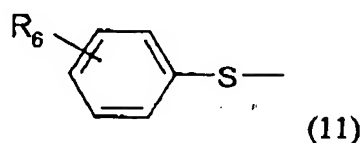
wherein  $R_{19}$  is selected from the group consisting of H, halogen, CN,  $NO_2$ ,  $CH_3$ ,  $C_2H_5$ ,  $C_3H_7$ ,  $CH=CH_2$ ,  $CF_3$ ,  $C_2F_5$  and  $C_3F_7$ , and in a case where there exist a plurality of units,  $R_{19}$  may be different for each unit;



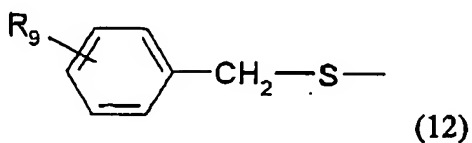
wherein  $R_4$  is selected from the group consisting of H, halogen, CN,  $NO_2$ ,  $CH_3$ ,  $C_2H_5$ ,  $C_3H_7$ ,  $SCH_3$ ,  $CF_3$ ,  $C_2F_5$  and  $C_3F_7$ , and in a case where there exist a plurality of units,  $R_4$  may be different for each unit;



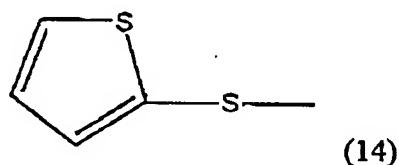
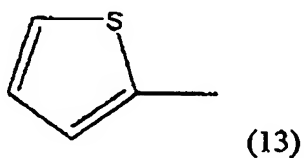
wherein  $R_5$  is selected from the group consisting of H, halogen, CN,  $NO_2$ ,  $CH_3$ ,  $C_2H_5$ ,  $C_3H_7$ ,  $CF_3$ ,  $C_2F_5$  and  $C_3F_7$ , and in a case where there exist a plurality of units,  $R_5$  may be different for each unit;

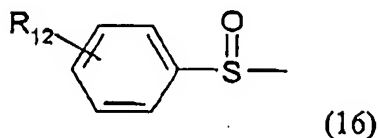
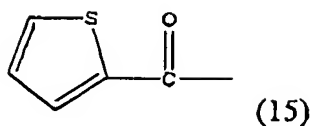


wherein  $R_6$  is selected from the group consisting of H, halogen, CN,  $\text{NO}_2$ ,  $\text{COOR}_7$ ,  $\text{SO}_2\text{R}_8$  (wherein  $R_7$  represents any one selected from the group consisting of H, Na, K,  $\text{CH}_3$  and  $\text{C}_2\text{H}_5$ , and  $R_8$  represents any one selected from the group consisting of OH, ONa, OK, halogen,  $\text{OCH}_3$  and  $\text{OC}_2\text{H}_5$ ),  $\text{CH}_3$ ,  $\text{C}_2\text{H}_5$ ,  $\text{C}_3\text{H}_7$ ,  $(\text{CH}_3)_2\text{-CH}$  and  $(\text{CH}_3)_3\text{-C}$ , and in a case where there exist a plurality of units,  $R_6$  may be different for each unit;

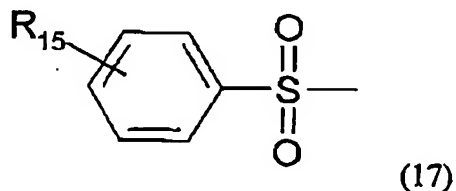


wherein  $R_9$  is selected from the group consisting of H, halogen, CN,  $\text{NO}_2$ ,  $\text{COOR}_{10}$ ,  $\text{SO}_2\text{R}_{11}$  (wherein  $R_{10}$  represents any one selected from the group consisting of H, Na, K,  $\text{CH}_3$  and  $\text{C}_2\text{H}_5$ , and  $R_{11}$  represents any one selected from the group consisting of OH, ONa, OK, halogen,  $\text{OCH}_3$  and  $\text{OC}_2\text{H}_5$ ),  $\text{CH}_3$ ,  $\text{C}_2\text{H}_5$ ,  $\text{C}_3\text{H}_7$ ,  $(\text{CH}_3)_2\text{-CH}$  and  $(\text{CH}_3)_3\text{-C}$ , and in a case where there exist a plurality of units,  $R_9$  may be different for each unit;





wherein  $R_{12}$  is selected from the group consisting of H, halogen, CN,  $\text{NO}_2$ ,  $\text{COOR}_{13}$ ,  $\text{SO}_2\text{R}_{14}$  (wherein  $R_{13}$  represents any one selected from the group consisting of H, Na, K,  $\text{CH}_3$  and  $\text{C}_2\text{H}_5$ , and  $R_{14}$  represents any one selected from the group consisting of OH, ONa, OK, halogen,  $\text{OCH}_3$  and  $\text{OC}_2\text{H}_5$ ),  $\text{CH}_3$ ,  $\text{C}_2\text{H}_5$ ,  $\text{C}_3\text{H}_7$ ,  $(\text{CH}_3)_2\text{-CH}$  and  $(\text{CH}_3)_3\text{-C}$ , and in a case where there exist a plurality of units,  $R_{12}$  may be different for each unit; and



wherein  $R_{15}$  is selected from the group consisting of H, halogen, CN,  $\text{NO}_2$ ,  $\text{COOR}_{16}$ ,  $\text{SO}_2\text{R}_{17}$  (wherein  $R_{16}$  represents any one selected from the group consisting of H, Na, K,  $\text{CH}_3$  and  $\text{C}_2\text{H}_5$ , and  $R_{17}$  represents any one selected from the group consisting of OH, ONa, OK, halogen,  $\text{OCH}_3$  and  $\text{OC}_2\text{H}_5$ ),  $\text{CH}_3$ ,  $\text{C}_2\text{H}_5$ ,  $\text{C}_3\text{H}_7$ ,  $(\text{CH}_3)_2\text{-CH}$  and  $(\text{CH}_3)_3\text{-C}$ , and in a case where there exist a plurality of units,  $R_{15}$  may be different for each unit.

29. (New) The method for producing a polyhydroxyalkanoate according

to claim 25, wherein said condition is that said microorganisms is cultured in a medium containing  $\omega$ -[(phenylmethyl)oxy]alkanoic acid expressed by chemical formula (19).

30. (New) The method for producing a polyhydroxyalkanoate according to claim 28, wherein said condition is that said microorganism is cultured in a medium containing the  $\omega$ -[(phenylmethyl)oxy]alkanoic acid expressed by chemical formula (19) and the alkanoic acid expressed by chemical formula (20) or the  $\omega$ -cyclohexylalkanoic acid expressed by chemical formula (21).

31. (New) The method for producing a polyhydroxyalkanoate according to claim 29, wherein said medium contains at least one selected from the group consisting of peptides, yeast extract, organic acids or salts thereof, amino acids or salts thereof, saccharides and straight-chain alkanoic acids, which is saturated or unsaturated fatty acid having 4 to 12 carbon atoms or salts thereof.

32. (New) The method for producing a polyhydroxyalkanoate according to claim 31, wherein the peptide is polypeptone; the organic acids or salts thereof are one or more compounds selected from the group consisting of pyruvic acid, oxaloacetic acid, citric acid, isocitric acid, ketoglutaric acid, succinic acid, fumaric acid, malic acid, lactic acid, and salts thereof; the amino acids or salts thereof are one or more compounds selected

from the group consisting of glutamic acid, aspartic acid, and salts thereof; and the saccharides are one or more compounds selected from the group consisting of glyceraldehyde, erythrose, arabinose, xylose, glucose, galactose, mannose, fructose, glycerol, erythritol, xylitol, gluconic acid, glucuronic acid and galacturonic acid, maltose, sucrose and lactose.

33. (New) The method for producing a polyhydroxyalkanoate according to claim 29, wherein said culture of microorganisms comprises two or more culturing steps.

34. (New) The method for producing a polyhydroxyalkanoate according to claim 33, wherein said culture is a fed-batch culture.

35. (New) The method for producing a polyhydroxyalkanoate according to claim 29, comprising a step of recovering a polyhydroxyalkanoate comprising 3-hydroxy- $\omega$ -[(phenylmethyl)oxy]alkanoic acid unit expressed by chemical formula (1) generated by the microorganism from the cells of the microorganism.

36. (New) The method for producing a polyhydroxyalkanoate according to claim 25, wherein said microorganism belongs to *Pseudomonas* species.

37. (New) The method for producing a polyhydroxyalkanoate according to claim 36, wherein said microorganism is one or more strains selected from the group consisting of *Pseudomonas cichorii* YN2 (FERM BP-7375), *Pseudomonas cichorii* H45 (FERM BP-7374) and *Pseudomonas jessenii* P161 (FERM BP-7376).

C. Remarks

Claims 21-37 are now presented for examination in lieu of original claims 1-20, which have been cancelled without prejudice or disclaimer. These new claims have been added to conform the claims in the present case to those allowed in counterpart Japanese Patent Application No. 2003-356749, from which this application claims priority benefit under 35 U.S.C. § 119. Claims 21-37 are supported by the original claims, as well as by the disclosure in the specification. No new matter has been added.

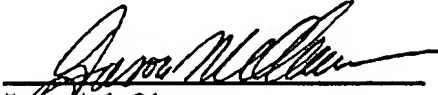
Applicants would like to point out that the microorganisms recited in claim 37 are the same as those in U.S. Patent No. 6,521,429 B2, which has the same Assignee as the present application. Thus, in view of the compliance with the biological material deposit requirements during the prosecution of the '429 patent, that material is deemed readily accessible to the public (M.P.E.P. § 2404.01). No further action should be necessary in the present case to comply with the deposit rules.

Applicants respectfully request favorable consideration and early passage to issue of the present application.



Applicants' undersigned attorney may be reached in our New York office by telephone at (212) 218-2100. All correspondence should continue to be directed to our below listed address.

Respectfully submitted,

  
\_\_\_\_\_  
Jason M. Okun  
Attorney for Applicants  
Registration No.: 48,512

FITZPATRICK, CELLA, HARPER & SCINTO  
30 Rockefeller Plaza  
New York, New York 10112-3801  
Facsimile: (212) 218-2200

03500.017652

PATENT APPLICATION

## IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

In re Application of:

TAKASHI KENMOKU ET AL.

Application No.: 10/531,572

Int'l Application No. PCT/JP03/13530

Filed: October 23, 2003

For: NEW  
POLYHYDROXYALKANOATE  
COMPRISING UNIT HAVING  
(PHENYLMETHYL)OXY  
STRUCTURE ON SIDE CHAIN  
THEREOF, AND METHOD FOR  
PRODUCING THE SAME

Examiner: S.M. Hanley

Group Art Unit: 1651

Confirmation No. 2325

September 17, 2007

Commissioner for Patents  
P.O. Box 1450  
Alexandria, VA 22313-1450

INFORMATION DISCLOSURE STATEMENT

Sir:

In compliance with the duty of disclosure under 37 C.F.R. § 1.56 and in accordance with the practice under 37 C.F.R. §§ 1.97 and 1.98, the Examiner's attention is directed to the documents listed on the attached Form PTO-1449. Since the U.S. Patent and Trademark Office waived the requirement under 37 C.F.R. § 1.98 (a)(2)(i) for

I hereby certify that this correspondence is being facsimile transmitted to  
the United States Patent and Trademark Office, Fax No. 1-571-273-0125  
on September 17, 2007  
(Date of Facsimile Transmission)

Jason M. Okun

(Attorney for Applicant)

Signature

September 17, 2007  
Date of Signature

submitting a copy of each cited U.S. patent and each U.S. patent application publication for all U.S. national patent applications and for all international applications that have entered the national stage under 35 U.S.C. § 371, no copies of such documents are provided.

Copies of the other listed documents are attached.

This Information Disclosure Statement is to make of record documents cited in an Office Action in a priority Japanese Application. A copy of the Office Action and its English language translation are attached.

The concise explanation of relevance for the non-English document may be found, *inter alia*, in the English language abstract attached thereto and/or in the above-noted Japanese Office Action. In addition, the concise explanation of relevance for JP 2003-319792 may be found in related U.S. Patent No. 6,649,380 B1 (already of record in the present case) and U.S. Patent Application Publication No. 2003/0208028 A1. The concise explanation of relevance for JP 2001-288256 may be found in related U.S. Patent No. 6,521,429 B2 (already of record in the present case).

#### CONCLUSION

It is respectfully requested that the above information be considered by the Examiner and that a copy of the attached Form PTO-1449 be returned indicating that such information has been considered.

Applicants' undersigned attorney may be reached in our New York office by telephone at (212) 218-2100. All correspondence should continue to be directed to our address given below.

Respectfully submitted,



Jacob M. Okun  
Attorney for Applicants  
Registration No.: 48,512

FITZPATRICK, CELLA, HARPER & SCINTO  
30 Rockefeller Plaza  
New York, New York 10112-3801  
Facsimile: (212) 218-2200

FORM PTO 1449 (modified) U.S. DEPARTMENT OF COMMERCE PATENT AND TRADEMARK OFFICE LIST OF REFERENCES CITED BY APPLICANT(S) (Use several sheets if necessary)				ATTY DOCKET NO. <b>03500.017652</b>		APPLICATION NO. <b>10/531,572</b>	
				APPLICANT <b>Takashi Kenmoku et al.</b>			
				FILING DATE <b>October 23, 2003</b>		GROUP <b>1651</b>	
U.S. PATENT DOCUMENTS							
EXAMINER INITIAL		DOCUMENT NUMBER	DATE	NAME	CLASS	SUBCLASS	FILING DATE IF APPROPRIATE
		2003/0208028	11/06/	Yano et al.	528	272	
FOREIGN PATENT DOCUMENTS							
		DOCUMENT NUMBER	DATE	COUNTRY	CLASS	SUBCLASS	TRANSLATION YES/NO/ OR ABSTRACT
	J	2003-319792	11/11/	Japan			Abstract
	J	2000-72865	03/07/	Japan			Abstract
	J	2001-288256	10/16/	Japan			Abstract
	J	7-31490	02/03/	Japan			Abstract
	J	7-82352	03/28/	Japan			Abstract
OTHER DOCUMENT(S) (Including Author, Title, Date, Pertinent Pages, Etc.)							
EXAMINER				DATE CONSIDERED			

\*EXAMINER: Initial if reference considered, whether or not citation is in conformance with MPEP 809; Draw line through citation if not in conformance and not considered. Include copy of this form with next communication to applicant.

Sheet 1 of 1

**METHOD FOR CONTROLLING MOLECULAR WEIGHT OF POLYHYDROXYALKANOATE IN WHICH UNITS CONTAINING PHENYL, THIENYL OR CYCLOHEXYL STRUCTURE-HAVING RESIDUES IN SIDE CHAINS ARE CONTAINED, AND POLYHYDROXYALKANOATE**

Publication number: JP2003318782

Publication date: 2003-11-11

Inventor: YANO TETSUYA; KENMOKU TAKASHI; HONMA TSUTOMU; SUGAWA ETSUKO; FUKUI SHIGE; IMAMURA TAKESHI

Applicant: CANON KK





Classification:

- International: C08G63/08; C08G63/68; C12P7/62; C12P11/00; C12P17/00; C12R1/38; C12R1/40; C08G63/09; C12P7/62; C12P11/00; C12P17/00; (IPC1-7): C12P7/62; C08G63/06; C12P11/00; C12P17/00; C12P7/62; C12R1/38; C12P11/00; C12R1/38; C12P17/00; C12R1/40

- European: C08G63/08; C08G63/68; C12P7/62A

Application number: JP20030036819 20030214

Priority number(s): JP20030036819 20030214; JP20020054907 20020228

**Also published as:** EP1340776 (A1)  
 US6649380 (B1)  
 US2003208028 (A1)  
 CN1285840C (C)

Report a data error here

**Abstract of JP2003318782**

**PROBLEM TO BE SOLVED:** To provide a method for controlling the molecular weight of a polyhydroxyalkanoate in which units containing phenyl, thienyl or cyclohexyl structure-having residues in side chains are contained, and to provide the polyhydroxyalkanoate having a controlled molecular weight.

**SOLUTION:** This method for controlling the molecular weight of the polyhydroxyalkanoate is characterized by having a process for culturing a microorganism having an ability for producing the polyhydroxyalkanoate from at least one of an [omega]-substituted alkanolic acid (3) having at least one of phenyl structure and thienyl structure and an [omega]-cyclohexylalkanoic acid (4) having a cyclohexyl structure in a culture medium containing at least one of the compound (3) and the compound (4) and a hydroxyl group-having compound.

COPYRIGHT: (C)2004,JPO

Data supplied from the *esp@cenet* database - Worldwide

(19)日本国特許庁 (J P)

## (12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号  
特開2003-319792  
(P2003-319792A)

(43)公開日 平成15年11月11日(2003.11.11)

(51)Int.Cl.	識別番号	F I	チーコード*(参考)
C 1 2 P 7/62		C 1 2 P 7/62	4 B 0 6 4
C 0 8 G 63/06		C 0 8 G 63/06	4 J 0 2 9
C 1 2 P 11/00		C 1 2 P 11/00	
17/00		17/00	
// (C 1 2 P 7/62		C 1 2 R 1:38	
審査請求 有 請求項の数12 O L (全 25 頁) 最終頁に続く			

(21)出願番号 特願2003-36819(P2003-36819)  
 (22)出願日 平成15年2月14日(2003.2.14)  
 (31)優先権主張番号 特願2002-54907(P2002-54907)  
 (32)優先日 平成14年2月28日(2002.2.28)  
 (33)優先権主張国 日本(J P)

(71)出願人 000001007  
キヤノン株式会社  
東京都大田区下丸子3丁目30番2号  
 (72)発明者 矢野 哲哉  
東京都大田区下丸子3丁目30番2号 キヤ  
ノン株式会社内  
 (72)発明者 見目 敬  
東京都大田区下丸子3丁目30番2号 キヤ  
ノン株式会社内  
 (74)代理人 100123788  
弁理士 宮崎 昭夫 (外3名)

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 側鎖にフェニル構造、チエニル構造、シクロヘキシル構造を有する残基を含むユニットを分子中に含むポリヒドロキシアルカノエートの分子量制御方法、およびポリヒドロキシアルカノエート

## (57)【要約】

【課題】 側鎖にフェニル構造、チオフェン構造、シクロヘキシル構造を有する残基を含むユニットを分子中に含むポリヒドロキシアルカノエートの分子量制御方法ならびに分子量が制御されたポリヒドロキシアルカノエートを提供することにある。

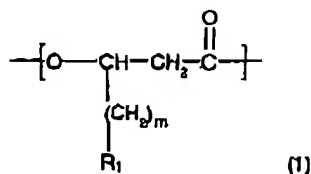
【解決手段】 フェニル構造、チエニル構造の少なくとも1種を有する $\omega$ -置換アルカン酸(3)、あるいは、シクロヘキシル構造を有する $\omega$ -シクロヘキシルアルカン酸(4)、の少なくとも1種類の化合物と、水酸基を有する化合物と、を含む培地で、前記(3)あるいは前記(4)の少なくとも1種類の化合物からポリヒドロキシアルカノエートを生産する能力を有する微生物を培養する工程を有することを特徴とするポリヒドロキシアルカノエートの分子量制御方法。

(2) 003-319792 (P2003-319792A)

【特許請求の範囲】

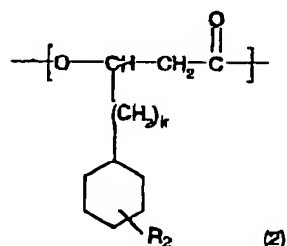
【請求項1】 下記式(1)：

【化1】



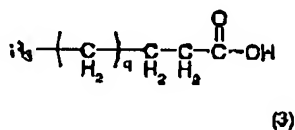
(mは1～8の整数を表し、R<sub>1</sub>はフェニル構造、チエニル構造の少なくとも1種を有する残基を示す。但し、複数のユニットが存在する場合、少なくとも2個のユニット間でm及びR<sub>1</sub>の少なくとも一方が異なるものであってもよい。)で示される3-ヒドロキシ-ω-置換アルカン酸ユニット、あるいは、式(2)：

【化2】



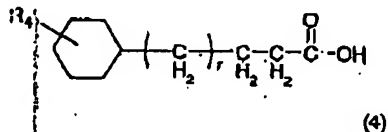
(kは0～8の整数を表し、R<sub>2</sub>はシクロヘキシル基への置換基を示し、R<sub>2</sub>はH原子、CN基、NO<sub>2</sub>基、ハロゲン原子、CH<sub>3</sub>基、C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>基、C<sub>3</sub>H<sub>7</sub>基、CF<sub>3</sub>基、C<sub>2</sub>F<sub>5</sub>基、C<sub>3</sub>F<sub>7</sub>基から選択された少なくとも一種である。但し、複数のユニットが存在する場合、少なくとも2個のユニット間でk及びR<sub>2</sub>の少なくとも一方が異なるものであってもよい。)で示される3-ヒドロキシ-ω-シクロヘキシルアルカン酸ユニット、の少なくとも1種類のユニットを分子中に含むポリヒドロキシアルカノエートの分子量制御方法において、式(3)：

【化3】



(qは1～8の整数を表し、R<sub>3</sub>はフェニル構造、チエニル構造の少なくとも1種を有する残基を示す。)で示されるω-置換アルカン酸、あるいは、式(4)：

【化4】

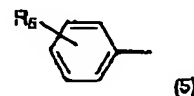


(rは0～8の整数を表し、R<sub>4</sub>はシクロヘキシル基へ

の置換基を示し、R<sub>4</sub>はH原子、CN基、NO<sub>2</sub>基、ハロゲン原子、CH<sub>3</sub>基、C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>基、C<sub>3</sub>H<sub>7</sub>基、CF<sub>3</sub>基、C<sub>2</sub>F<sub>5</sub>基、C<sub>3</sub>F<sub>7</sub>基から選択された少なくとも一種である。)で示されるω-シクロヘキシルアルカン酸、の少なくとも1種類の化合物と、水酸基を有する化合物と、を含む培地で、前記式(3)あるいは前記式(4)で示される少なくとも1種類の化合物からポリヒドロキシアルカノエートを生産する能力を有する微生物を培養する工程を有することを特徴とするポリヒドロキシアルカノエートの分子量制御方法。

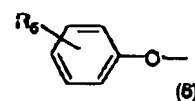
【請求項2】 前記R<sub>1</sub>およびR<sub>3</sub>が、式(5)：

【化5】



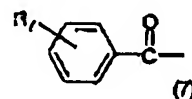
(式中、R<sub>5</sub>は芳香環への置換基を示し、R<sub>5</sub>はH原子、ハロゲン原子、CN基、NO<sub>2</sub>基、CH<sub>3</sub>基、C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>基、C<sub>3</sub>H<sub>7</sub>基、CH=CH<sub>2</sub>基、COOR<sub>61</sub> (R<sub>61</sub>はH原子、Na原子、K原子のいずれかを表し、R<sub>1</sub>の場合のみ選択される。)、CF<sub>3</sub>基、C<sub>2</sub>F<sub>5</sub>基、C<sub>3</sub>F<sub>7</sub>基から選択された少なくとも一種である。)で示される無置換または置換フェニル基群；式(6)：

【化6】



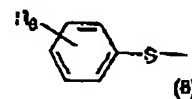
(式中、R<sub>6</sub>は芳香環への置換基を示し、R<sub>6</sub>はH原子、ハロゲン原子、CN基、NO<sub>2</sub>基、CH<sub>3</sub>基、C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>基、C<sub>3</sub>H<sub>7</sub>基、SCH<sub>3</sub>基、CF<sub>3</sub>基、C<sub>2</sub>F<sub>5</sub>基、C<sub>3</sub>F<sub>7</sub>基から選択された少なくとも一種である。)で示される無置換または置換フェノキシ基群；式(7)：

【化7】



(式中、R<sub>7</sub>は芳香環への置換基を示し、R<sub>7</sub>はH原子、ハロゲン原子、CN基、NO<sub>2</sub>基、CH<sub>3</sub>基、C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>基、C<sub>3</sub>H<sub>7</sub>基、CF<sub>3</sub>基、C<sub>2</sub>F<sub>5</sub>基、C<sub>3</sub>F<sub>7</sub>基から選択された少なくとも一種である。)で示される無置換または置換ベンゾイル基群；式(8)：

【化8】

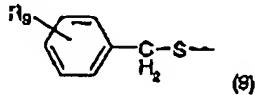


(式中、R<sub>8</sub>は芳香環への置換基を示し、R<sub>8</sub>はH原子、ハロゲン原子、CN基、NO<sub>2</sub>基、COOR<sub>81</sub> (R<sub>81</sub>は

(3) 003-319792 (P2003-319792A)

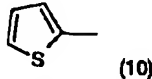
H原子、Na原子、K原子、CH<sub>3</sub>基、C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>基のいずれかを表す。)、SO<sub>2</sub>R<sub>92</sub> (R<sub>92</sub>はOH基、ONa基、OK基、ハロゲン原子、OCH<sub>3</sub>基、OC<sub>2</sub>H<sub>5</sub>のいずれかを表す。)、CH<sub>3</sub>基、C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>基、C<sub>3</sub>H<sub>7</sub>基、(C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>)<sub>2</sub>-CH基、(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>-C基から選択された少なくとも一種である。)で示される無置換または置換フェニルスルファニル基群; 式(9):

【化9】



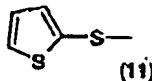
(式中、R<sub>9</sub>は芳香環への置換基を示し、R<sub>9</sub>はH原子、ハロゲン原子、CN基、NO<sub>2</sub>基、COOR<sub>91</sub> (R<sub>91</sub>はH原子、Na原子、K原子、CH<sub>3</sub>基、C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>基のいずれかを表す。)、SO<sub>2</sub>R<sub>92</sub> (R<sub>92</sub>はOH基、ONa基、OK基、ハロゲン原子、OCH<sub>3</sub>基、OC<sub>2</sub>H<sub>5</sub>のいずれかを表す。)、CH<sub>3</sub>基、C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>基、C<sub>3</sub>H<sub>7</sub>基、(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>-CH基、(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>-C基から選択された少なくとも一種である。)で示される無置換または置換(フェニルメチル)スルファニル基群; 式(10):

【化10】



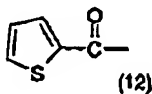
で示される2-チエニル基; 式(11):

【化11】



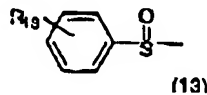
で示される2-チエニルスルファニル基; 式(12):

【化12】



で示される2-チエニルカルボニル基; 式(13):

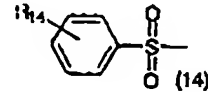
【化13】



(式中、R<sub>13</sub>は芳香環への置換基を示し、R<sub>13</sub>はH原子、ハロゲン原子、CN基、NO<sub>2</sub>基、COOR<sub>131</sub> (R<sub>131</sub>はH原子、Na原子、K原子、CH<sub>3</sub>基、C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>基のいずれかを表す。)、SO<sub>2</sub>R<sub>132</sub> (R<sub>132</sub>はOH基、ONa基、OK基、ハロゲン原子、OCH<sub>3</sub>基、OC<sub>2</sub>H<sub>5</sub>のいずれかを表す。)、CH<sub>3</sub>基、C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>基、C<sub>3</sub>H<sub>7</sub>基、(C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>)<sub>2</sub>-CH基、(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>-C基から選択された少なくとも一種である。)で示されるR<sub>1</sub>の場合のみ選択される

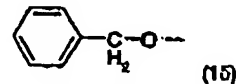
無置換または置換フェニルスルフィニル基群; 式(14):

【化14】



(式中、R<sub>14</sub>は芳香環への置換基を示し、R<sub>14</sub>はH原子、ハロゲン原子、CN基、NO<sub>2</sub>基、COOR<sub>141</sub> (R<sub>141</sub>はH原子、Na原子、K原子、CH<sub>3</sub>基、C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>基のいずれかを表す。)、SO<sub>2</sub>R<sub>142</sub> (R<sub>142</sub>はOH基、ONa基、OK基、ハロゲン原子、OCH<sub>3</sub>基、OC<sub>2</sub>H<sub>5</sub>のいずれかを表す。)、CH<sub>3</sub>基、C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>基、C<sub>3</sub>H<sub>7</sub>基、(C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>)<sub>2</sub>-CH基、(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>-C基から選択された少なくとも一種である。)で示されるR<sub>1</sub>の場合のみ選択される無置換または置換フェニルスルホニル基群; 及び、式(15):

【化15】



で示される(フェニルメチル)オキシ基; から選択された残基である請求項1に記載の分子量制御方法。

【請求項3】 前記水酸基を有する化合物が、アルコール類、ジオール類、トリオール類、アルキレングリコール類、ポリエチレングリコール類、ポリエチレンオキサイド類、アルキレングリコールモノエステル類、ポリエチレングリコールモノエステル類及びポリエチレンオキサイドモノエステル類化合物から選ばれる少なくとも1種類である請求項1または2に記載の分子量制御方法。

【請求項4】 前記アルコール類、ジオール類及びトリオール類化合物が、炭素数3から14の直鎖状及び分岐状のアルコール類、ジオール類及びトリオール類である請求項3に記載の分子量制御方法。

【請求項5】 前記アルキレングリコール類及びアルキレングリコールモノエステル類化合物の炭素鎖が、炭素数2から10の直鎖状及び分岐状構造を有している請求項3に記載の分子量制御方法。

【請求項6】 前記ポリエチレングリコール類、ポリエチレンオキサイド類、ポリエチレングリコールモノエステル類、ポリエチレンオキサイドモノエステル類化合物の数平均分子量が、100から20000の範囲である請求項3に記載の分子量制御方法。

【請求項7】 前記水酸基を有する化合物の濃度が、微生物培養の際の培地に対して0.01%から10%(質量/容量)である請求項1から6のいずれかに記載の分子量制御方法。

【請求項8】 前記水酸基を有する化合物の濃度が、微生物培養の際の培地に対して0.02%から5%(質量/容量)である請求項7に記載の分子量制御方法。



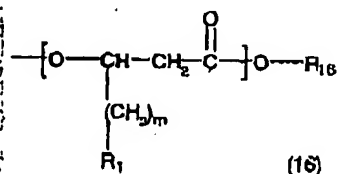
(4) 003-319792 (P2003-319792A)

【請求項9】 前記微生物が、シュードモナス (*Pseudomonas*) 属に属する微生物である請求項1から8のいずれかに記載の分子量制御方法。

【請求項10】 前記微生物が、シュードモナス チコリアイ YN2株 (*Pseudomonas cichorii* YN2; FERM BP-7375)、シュードモナス チコリアイ H45株 (*Pseudomonas cichorii* H45; FERM BP-7374)、シュードモナス ジェッセニ P161株 (*Pseudomonas jessenii* P161; FERM BP-7376) 及びシュードモナス プチダ P91株 (*Pseudomonas putida* P91; FERM BP-7373) の1つ以上の株である請求項9に記載の分子量制御方法。

【請求項11】 下記式(16)：

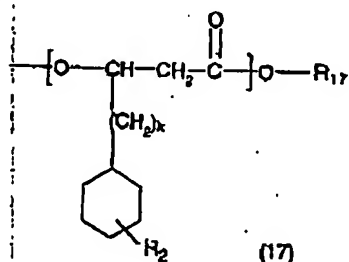
【化16】



(16)

(mは1～8の整数を表し、R<sub>1</sub>はフェニル構造、チエニル構造の少なくとも1種を有する残基を示す。但し、複数のユニットが存在する場合、少なくとも2個のユニット間でm及びR<sub>1</sub>の少なくとも一方が異なるものであってもよい。R<sub>16</sub>はアルコール類、ジオール類、トリオール類、アルキレングリコール類、ポリエチレングリコール類、ポリエチレンオキサイド類、アルキレングリコールモノエステル類、ポリエチレングリコールモノエステル類、ポリエチレンオキサイドモノエステル類化合物から選ばれる少なくとも1種類に由来する基である。)で示される3-ヒドロキシ-ω-置換アルカン酸ユニット、あるいは、式(17)：

【化17】



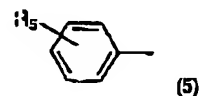
(17)

(kは0～8の整数を表し、R<sub>2</sub>はシクロヘキシル基への置換基を示し、R<sub>2</sub>はH原子、CN基、NO<sub>2</sub>基、ハロゲン原子、CH<sub>3</sub>基、C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>基、C<sub>3</sub>H<sub>7</sub>基、CF<sub>3</sub>基、C<sub>2</sub>F<sub>5</sub>基、C<sub>3</sub>F<sub>7</sub>基から選択された少なくとも一種である。但し、複数のユニットが存在する場合、少なくとも2個のユニット間でk及びR<sub>2</sub>の少なくとも一方が異なるものであってもよい。R<sub>17</sub>はアルコール類、ジオール類、トリオール類、アルキレングリコール類、ポリエチレングリコール類、ポリエチレンオキサイド類、アルキレングリコールモノエステル類、ポリエチレンオキサイドモノエステル類化合物から選ばれる少なくとも1種類に由来する基である。)で示される3-ヒドロキシ-ω-置換アルカン酸ユニット、あるいは、式(18)：

るものであってもよい。R<sub>17</sub>はアルコール類、ジオール類、トリオール類、アルキレングリコール類、ポリエチレングリコール類、ポリエチレンオキサイド類、アルキレングリコールモノエステル類、ポリエチレングリコールモノエステル類、ポリエチレンオキサイドモノエステル類化合物から選ばれる少なくとも1種類に由来する基である。)で示される3-ヒドロキシ-ω-シクロヘキシルアルカン酸ユニット、の少なくとも1種類のユニットを分子中に含むポリヒドロキシアルカノエート。

【請求項12】 前記R<sub>1</sub>が、式(5)：

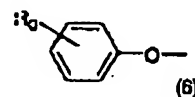
【化18】



(5)

(式中、R<sub>5</sub>は芳香環への置換基を示し、R<sub>5</sub>はH原子、ハロゲン原子、CN基、NO<sub>2</sub>基、CH<sub>3</sub>基、C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>基、C<sub>3</sub>H<sub>7</sub>基、CH=CH<sub>2</sub>基、COOR<sub>51</sub> (R<sub>51</sub>はH原子、Na原子、K原子のいずれかを表す。)、CF<sub>3</sub>基、C<sub>2</sub>F<sub>5</sub>基、C<sub>3</sub>F<sub>7</sub>基から選択された少なくとも一種である。)で示される無置換または置換フェニル基群；式(6)：

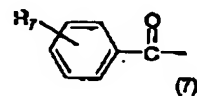
【化19】



(6)

(式中、R<sub>6</sub>は芳香環への置換基を示し、R<sub>6</sub>はH原子、ハロゲン原子、CN基、NO<sub>2</sub>基、CH<sub>3</sub>基、C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>基、C<sub>3</sub>H<sub>7</sub>基、SCH<sub>3</sub>基、CF<sub>3</sub>基、C<sub>2</sub>F<sub>5</sub>基、C<sub>3</sub>F<sub>7</sub>基から選択された少なくとも一種である。)で示される無置換または置換フェノキシ基群；式(7)：

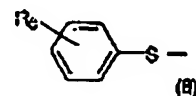
【化20】



(7)

(式中、R<sub>7</sub>は芳香環への置換基を示し、R<sub>7</sub>はH原子、ハロゲン原子、CN基、NO<sub>2</sub>基、CH<sub>3</sub>基、C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>基、C<sub>3</sub>H<sub>7</sub>基、CF<sub>3</sub>基、C<sub>2</sub>F<sub>5</sub>基、C<sub>3</sub>F<sub>7</sub>基から選択された少なくとも一種である。)で示される無置換または置換ベンゾイル基群；式(8)：

【化21】



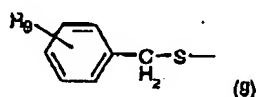
(8)

(式中、R<sub>8</sub>は芳香環への置換基を示し、R<sub>8</sub>はH原子、ハロゲン原子、CN基、NO<sub>2</sub>基、COOR<sub>81</sub> (R<sub>81</sub>はH原子、Na原子、K原子、CH<sub>3</sub>基、C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>基のい

(5) 003-319792 (P2003-319792A)

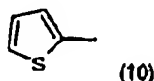
れかを表す。)、 $\text{SO}_2\text{R}_{92}$  ( $\text{R}_{92}$ はOH基、ONa基、OK基、ハロゲン原子、 $\text{OCH}_3$ 基、 $\text{OC}_2\text{H}_5$ のいずれかを表す。)、 $\text{CH}_3$ 基、 $\text{C}_2\text{H}_5$ 基、 $\text{C}_3\text{H}_7$ 基、 $(\text{CH}_3)_2\text{-CH}$ 基、 $(\text{CH}_3)_3\text{-C}$ 基から選択された少なくとも一種である。)で示される無置換または置換フェニルスルファニル基群; 式(9):

【化22】



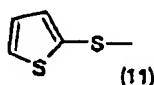
(式中、 $\text{R}_9$ は芳香環への置換基を示し、 $\text{R}_9$ はH原子、ハロゲン原子、CN基、 $\text{NO}_2$ 基、 $\text{COOR}_{91}$  ( $\text{R}_{91}$ はH原子、Na原子、K原子、 $\text{CH}_3$ 基、 $\text{C}_2\text{H}_5$ 基のいずれかを表す)、 $\text{SO}_2\text{R}_{92}$  ( $\text{R}_{92}$ はOH基、ONa基、OK基、ハロゲン原子、 $\text{OCH}_3$ 基、 $\text{OC}_2\text{H}_5$ のいずれかを表す)、 $\text{CH}_3$ 基、 $\text{C}_2\text{H}_5$ 基、 $\text{C}_3\text{H}_7$ 基、 $(\text{CH}_3)_2\text{-CH}$ 基、 $(\text{CH}_3)_3\text{-C}$ 基から選択された少なくとも一種である。)で示される無置換または置換(フェニルメチル)スルファニル基群; 式(10):

【化23】



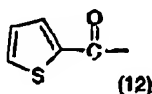
で示される2-チエニル基; 式(11):

【化24】



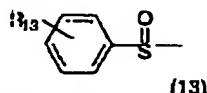
で示される2-チエニルスルファニル基; 式(12):

【化25】



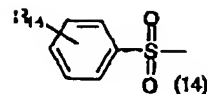
で示される2-チエニルカルボニル基; 式(13):

【化26】



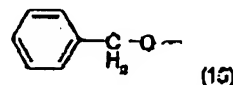
(式中、 $\text{R}_{13}$ は芳香環への置換基を示し、 $\text{R}_{13}$ はH原子、ハロゲン原子、CN基、 $\text{NO}_2$ 基、 $\text{COOR}_{131}$  ( $\text{R}_{131}$ はH原子、Na原子、K原子、 $\text{CH}_3$ 基、 $\text{C}_2\text{H}_5$ 基のいずれかを表す)、 $\text{SO}_2\text{R}_{132}$  ( $\text{R}_{132}$ はOH基、ONa基、OK基、ハロゲン原子、 $\text{OCH}_3$ 基、 $\text{OC}_2\text{H}_5$ のいずれかを表す)、 $\text{CH}_3$ 基、 $\text{C}_2\text{H}_5$ 基、 $\text{C}_3\text{H}_7$ 基、 $(\text{CH}_3)_2\text{-CH}$ 基、 $(\text{CH}_3)_3\text{-C}$ 基から選択された少なくとも一種である。)で示される無置換または置換フェニルスルフィニル基群; 式(14):

【化27】



(式中、 $\text{R}_{14}$ は芳香環への置換基を示し、 $\text{R}_{14}$ はH原子、ハロゲン原子、CN基、 $\text{NO}_2$ 基、 $\text{COOR}_{141}$  ( $\text{R}_{141}$ はH原子、Na原子、K原子、 $\text{CH}_3$ 基、 $\text{C}_2\text{H}_5$ 基のいずれかを表す)、 $\text{SO}_2\text{R}_{142}$  ( $\text{R}_{142}$ はOH基、ONa基、OK基、ハロゲン原子、 $\text{OCH}_3$ 基、 $\text{OC}_2\text{H}_5$ のいずれかを表す)、 $\text{CH}_3$ 基、 $\text{C}_2\text{H}_5$ 基、 $\text{C}_3\text{H}_7$ 基、 $(\text{CH}_3)_2\text{-CH}$ 基、 $(\text{CH}_3)_3\text{-C}$ 基から選択された少なくとも一種である。)で示される無置換または置換フェニルスルホニル基群; 及び、式(15):

【化28】



で示される(フェニルメチル)オキシ基; から選択された残基である請求項11に記載のポリヒドロキシアルカノエート。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明はポリエステル的一种であるポリヒドロキシアルカノエート(PHA)の分子量制御方法に関する。更に詳しくは、当該PHAを生産し体内に蓄積する微生物を用いた当該PHAの分子量制御方法に関する。

【0002】

【従来の技術】これまで、多くの微生物がポリ-3-ヒドロキシ酪酸(PHB)あるいはその他のPHAを生産し、菌体内に蓄積することが報告されてきた(「生分解性プラスチックハンドブック」、生分解性プラスチック研究会編、(株)エヌ・ティー・エス、P178-197(1995)) (非特許文献1)。これらのポリマーは従来のプラスチックと同様に、溶融加工等により各種製品の生産に利用することができる。さらに、生分解性であるがゆえに、自然界で微生物により完全分解されるという利点を有しており、従来の多くの合成高分子化合物のように自然環境に残留して汚染を引き起こすことがない。また、生体適合性にも優れており、医療用軟質部材等としての応用も期待されている。

【0003】このような微生物産生PHAは、その生産に用いる微生物の種類や培地組成、培養条件等により、様々な組成や構造のものとなり得ることが知られており、これまで主に、PHAの物性の改良という観点から、このような組成や構造の制御に関する研究がなされてきた。

【0004】微生物産生PHAはその生合成機構から大きく2種類に分類することができる。一方は、ポリヒドロキシ酪酸(PHB)、ポリヒドロキシ吉草酸(PH)

(6) 003-319792 (P2003-319792A)

V)、或いはこれらの共重合体に代表される短鎖長PHA (short-chain-length PHA; 以降sc1-PHAと記す)であり、他方は炭素鎖長が6から14程度までの中鎖長3-ヒドロキシアルカン酸をユニットとする中鎖長PHA (medium-chain-length PHA; 以降mcl-PHAと記す)である。

【0005】前者、即ちsc1-PHAは、グルコースやグルコニック酸といった糖類や、乳酸、ヒルビン酸、リンゴ酸といった有機酸類が生体内で代謝された産物であるアセチルCoAを出発物質とし、酵素的に二量体化、還元作用を受けてポリマー化される。

【0006】後者、即ちmcl-PHAは、アルカン酸を出発物質とし、脂肪酸分解系である $\beta$ 酸化経路により酵素的にCoA付加、脱水素化、水付加反応を経てポリマー化される。

【0007】この様に両者は全く異なる生成経路を経て合成され、実際生体内の酵素群も異なっていることが詳細な研究により明らかとなっている。

【0008】また、後者、即ちmcl-PHAを生産する微生物のうち、ある種の微生物は様々な官能基、残基を含むPHAを生産することが知られている。

【0009】その中でも、近年ユニット中に芳香環を有するPHAの研究が盛んになされている。例えば、Macromol. Chem., 191, 1957-1965 (1990) (非特許文献2)及びMacromolecules, 24, 5256-5260 (1991) (非特許文献3)には、5-フェニル吉草酸を基質として、シュードモナス オレオボランス (Pseudomonas oleovorans) が3-ヒドロキシ-5-フェニル吉草酸をユニットとして含むPHAを生産することが報告されている。また、Macromolecules, 29, 1762-1766 (1996) (非特許文献4)には、5-(4'-トリル)吉草酸を基質として、シュードモナス オレオボランス (Pseudomonas oleovorans) が3-ヒドロキシ-5-(4'-トリル)吉草酸をユニットとして含むPHAを生産することが報告されている。

【0010】更に、Macromolecules, 32, 2889-2895 (1999) (非特許文献5)には、5-(2', 4'-ジニトロフェニル)吉草酸を基質として、シュードモナス オレオボランス (Pseudomonas oleovorans) が3-ヒドロキシ-5-(2', 4'-ジニトロフェニル)吉草酸及び3-ヒドロキシ-5-(4'-ニトロフェニル)吉草酸をユニットとして含むPHAを生産することが報告されている。また、Macromol. Chem. Phys., 195, 1665-1672 (1994) (非特許文献6)には、11-フェノキシウンデカン酸を基質として、シュードモナス オレオボランス (Pseu-

domonas oleovorans) が3-ヒドロキシ-5-フェノキシ吉草酸と3-ヒドロキシ-9-フェノキシノナン酸のPHAコポリマーを生産することが報告されている。

【0011】一方、特許第2989175号明細書(特許文献1)には、3-ヒドロキシ-5-(モノフルオロフェノキシ)ペンタノエート(3H5(MFP)P)ユニットあるいは3-ヒドロキシ-5-(ジフルオロフェノキシ)ペンタノエート(3H5(DFP)P)ユニットからなるホモポリマー、少なくとも3H5(MFP)Pユニットあるいは3H5(DFP)Pユニットを含有するコポリマー; これらのポリマーを合成するシュードモナス・プチダ; シュードモナス属を用いた前記のポリマーの製造法に関する発明が開示されており、その効果として、置換基をもつ長鎖脂肪酸を資化して、側鎖末端が1から2個のフッ素原子が置換したフェノキシ基をもつポリマーを合成することができ、融点が高く良い加工性を保持しながら、立体規則性、親水性を与えることができるとしている。

【0012】この様なフッ素基置換体以外に、シアノ基やニトロ基の置換体の研究もなされている。例えば、Can. J. Microbiol., 41, 32-43 (1995) (非特許文献7)及びPolymer International, 39, 205-213 (1996) (非特許文献8)には、シュードモナス オレオボランス (Pseudomonas oleovorans) ATCC29347株及びシュードモナス プチダ (Pseudomonas putida) KT2442株を用いて、オクタン酸とp-シアノフェノキシヘキサン酸或いはp-ニトロフェノキシヘキサン酸を基質として、3-ヒドロキシ-p-シアノフェノキシヘキサン酸或いは3-ヒドロキシ-p-ニトロフェノキシヘキサン酸をモノマーユニットとして含むPHAの生産が報告されている。

【0013】また、新たなカテゴリーとしては、Macromolecules, 32, 8315-8318 (1999) (非特許文献9)及びPolymer Preprints, Japan, 49(5), 1034 (2000) (非特許文献10)には、シュードモナス プチダ (Pseudomonas putida) 27N01株が11-チオフェノキシ吉草酸を基質とし、3-ヒドロキシ-5-チオフェノキシ吉草酸及び3-ヒドロキシ-7-チオフェノキシヘプタン酸のPHAコポリマーを生産することが報告されている。

【0014】この様なPHAの実用に際し、その応用範囲を広げる意味からその分子量の制御が試みられている。

【0015】米国特許6,156,852号(特許文献2)には、Ralstonia eutropha, Ralstonia latus及びComamonas

(7) 003-319792 (P2003-319792A)

testosteroniを生産菌株として用い、PHBを生合成する際の培養培地中にエチレングリコール、ネオペンタグリコール、プロピレングリコール、ブタンジオールやヘキサジオール、オクタジオールといったジオール類、ブタントリオール、ポリプロピレングリコール、グリセロール、ハイドロキノン、ベンゼンジメタノール、ペンタエリスリトール及びその誘導体、ソルビトールやマンニトールといった糖アルコール類を加えることによって数平均分子量を低下せしめることが可能であることが開示されている。これらの内容は、化学論文としてBiotechnology and Bioengineering, 62, 106-113 (1999) (非特許文献11)、及びInternational Journal of Biological Macromolecules, 25, 43-53 (1999) (非特許文献12)に詳細に報告されている。

【0016】

【特許文献1】特許第2989175号明細書

【特許文献2】米国特許6,156,852

【特許文献3】特開2001-288256号公報

【0017】

【非特許文献1】「生分解性プラスチックハンドブック」、生分解性プラスチック研究会編、(株)エヌ・ディー・エヌ、P178-197 (1995)

【非特許文献2】Makromol. Chem., 191, 1957-1965 (1990)

【非特許文献3】Macromolecules, 24, 5256-5260 (1991)

【非特許文献4】Macromolecules, 29, 1762-1766 (1996)

【非特許文献5】Macromolecules, 32, 2889-2895 (1999)

【非特許文献6】Macromol. Chem. Phys., 195, 1665-1672 (1994)

【非特許文献7】Can. J. Microbiol., 41, 32-43 (1995)

【非特許文献8】Polymer International, 39, 205-213 (1996)

【非特許文献9】Macromolecules, 32, 8315-8318 (1999)

【非特許文献10】Polymer Preprints, Japan, 49 (5), 1034 (2000)

【非特許文献11】Biotechnology and Bioengineering, 62, 106-113 (1999)

【非特許文献12】International Journal of Biological Macromolecules, 25, 43-53 (1999)

【非特許文献13】FEMS Microbiolog

y Reviews, 103, 217-230 (1992)

【非特許文献14】Journal of Biotechnology, 65, 127-161 (1998)

【0018】

【発明が解決しようとする課題】この様な分子量制御技術は、酸やアルカリといった化学物質を用いることなく、PHAの生合成プロセス中で行う事ができるというメリットを有しており、先に示したように、フェニル基等の官能基を有するPHAに関しても、その実用用途の範囲を拡げる意味から分子量の制御技術が要求されているが、そのような技術はこれまで開発されて来なかった。

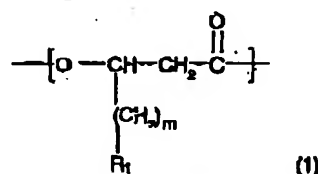
【0019】本発明の目的は、側鎖にフェニル構造、チオフェン構造、シクロヘキシル構造を有する残基を含むユニットを分子中に含むポリヒドロキシアルカノエートの分子量制御方法を提供することにある。

【0020】

【課題を解決するための手段】本発明者らは上記の課題を解決すべく鋭意研究の結果、以下のような発明に至った。即ち、本発明は、下記式(1)：

【0021】

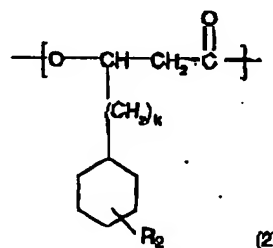
【化29】



【0022】(mは1~8の整数を表し、R<sub>1</sub>はフェニル構造、チエニル構造の少なくとも1種を有する残基を示す。但し、複数のユニットが存在する場合、少なくとも2個のユニット間でm及びR<sub>1</sub>の少なくとも一方が異なるものであってもよい。)で示される3-ヒドロキシ-ω-置換アルカン酸ユニット、あるいは、式(2)：

【0023】

【化30】



【0024】(kは0~8の整数を表し、R<sub>2</sub>はシクロヘキシル基への置換基を示し、R<sub>2</sub>はH原子、CN基、NO<sub>2</sub>基、ハロゲン原子、CH<sub>3</sub>基、C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>基、C<sub>3</sub>H<sub>7</sub>基、CF<sub>3</sub>基、C<sub>2</sub>F<sub>5</sub>基、C<sub>3</sub>F<sub>7</sub>基から選択された少なくとも一種である。但し、複数のユニットが存在する場合

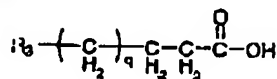
(8) 003-319792 (P2003-319792A)

合、少なくとも2個のユニット間でk及びR<sub>2</sub>の少なくとも一方が異なるものであってもよい。)で示される3-ヒドロキシ-ω-シクロヘキシルアルカン酸ユニット、の少なくとも1種類のユニットを分子中に含むポリヒドロキシアルカノエートの分子量制御方法において、式

(3):

【0025】

【化31】



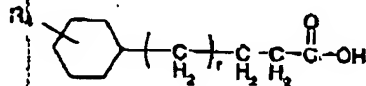
(3)

【0026】(qは1~8の整数を表し、R<sub>3</sub>はフェニル構造、チエニル構造の少なくとも1種を有する残基を示す。)で示されるω-置換アルカン酸、あるいは、式

(4):

【0027】

【化32】



(4)

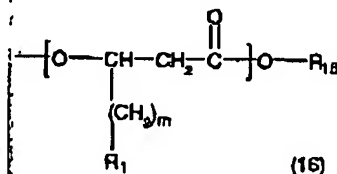
【0028】(rは0~8の整数を表し、R<sub>4</sub>はシクロヘキシル基への置換基を示し、R<sub>5</sub>はH原子、CN基、NO<sub>2</sub>基、ハロゲン原子、CH<sub>3</sub>基、C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>基、C<sub>3</sub>H<sub>7</sub>基、CF<sub>3</sub>基、C<sub>2</sub>F<sub>5</sub>基、C<sub>3</sub>F<sub>7</sub>基から選択された少なくとも一種である。)で示されるω-シクロヘキシルアルカン酸、の少なくとも1種類の化合物と、水酸基を有する化合物と、を含む培地で、前記式(3)あるいは前記式(4)で示される少なくとも1種類の化合物からポリヒドロキシアルカノエートを生産する能力を有する微生物を培養する工程を有することを特徴とするポリヒドロキシアルカノエートの分子量制御方法である。

【0029】本発明は、水酸基を有する化合物を分子量制御剤として用いることで、微生物によるポリマー生成における分子量制御が可能である点に基づくもので、上記の構成により効果的な分子量制御を行うことを可能とするものである。

【0030】また、本発明は、下記式(16):

【0031】

【化33】



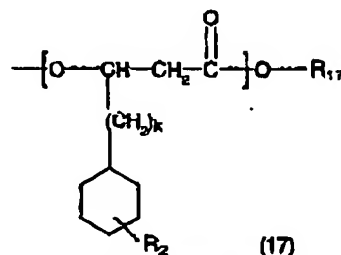
(16)

【0032】(mは1~8の整数を表し、R<sub>1</sub>はフェニ

ル構造、チエニル構造の少なくとも1種を有する残基を示す。但し、複数のユニットが存在する場合、少なくとも2個のユニット間でm及びR<sub>1</sub>の少なくとも一方が異なるものであってもよい。R<sub>18</sub>はアルコール類、ジオール類、トリオール類、アルキレングリコール類、ポリエチレングリコール類、ポリエチレンオキサイド類、アルキレングリコールモノエステル類、ポリエチレングリコールモノエステル類、ポリエチレンオキサイドモノエステル類化合物から選ばれる少なくとも1種類に由来する基である。)で示される3-ヒドロキシ-ω-置換アルカン酸ユニット、あるいは、式(17):

【0033】

【化34】



(17)

【0034】(kは0~8の整数を表し、R<sub>2</sub>はシクロヘキシル基への置換基を示し、R<sub>2</sub>はH原子、CN基、NO<sub>2</sub>基、ハロゲン原子、CH<sub>3</sub>基、C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>基、C<sub>3</sub>H<sub>7</sub>基、CF<sub>3</sub>基、C<sub>2</sub>F<sub>5</sub>基、C<sub>3</sub>F<sub>7</sub>基から選択された少なくとも一種である。但し、複数のユニットが存在する場合、少なくとも2個のユニット間でk及びR<sub>2</sub>の少なくとも一方が異なるものであってもよい。R<sub>17</sub>はアルコール類、ジオール類、トリオール類、アルキレングリコール類、ポリエチレングリコール類、ポリエチレンオキサイド類、アルキレングリコールモノエステル類、ポリエチレングリコールモノエステル類、ポリエチレンオキサイドモノエステル類化合物から選ばれる少なくとも1種類に由来する基である。)で示される3-ヒドロキシ-ω-シクロヘキシルアルカン酸ユニット、の少なくとも1種類のユニットを分子中に含むポリヒドロキシアルカノエートである。

【0035】

【発明の実施の形態】上記式(2)におけるR<sub>2</sub>、及び式(4)におけるR<sub>4</sub>は、シクロヘキシル基への置換基を示すものであり、そのシクロヘキシル基への置換基は全てが同一であっても、少なくとも2個の置換基間で異なるものであってもよい。

【0036】上記式(1)あるいは(2)で示される少なくとも1種類のユニットを分子中に含むポリヒドロキシアルカノエートは、式(1)で示されるユニットのみ有する、式(2)で示されるユニットのみ有する、式(1)で示されるユニットと式(2)で示されるユニットの両方を有する、のいずれでもよい。また、上記のポリヒドロキシアルカノエートが、式(1)で示される2

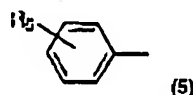
(9) 003-319792 (P2003-319792A)

以上のユニットを有する場合には、その全てのユニットの $m$ 及び $R_1$ が同一であっても、少なくとも2個のユニット間で $m$ 及び $R_1$ の少なくとも一方が異なるものが存在してもよい。式(1)における $m$ 及び $R_1$ の少なくとも一方を異ならせる場合には、式(3)で示されるモノマーとして、所望のユニット組成が生成されるポリヒドロキシアルカノエートに得られるように $q$ または $R_3$ の異なる少なくとも2種以上を用いる。同様に、上記のポリヒドロキシアルカノエートが、式(2)で示される2以上のユニットを有する場合には、その全てのユニットの $k$ 及び $R_2$ が同一であっても、少なくとも2個のユニット間で $k$ 及び $R_2$ の少なくとも一方が異なるものが存在してもよい。式(2)における $k$ 及び $R_2$ の少なくとも一方を異ならせる場合には、式(4)で示されるモノマーとして、所望のユニット組成が生成されるポリヒドロキシアルカノエートに得られるように $r$ または $R_4$ の異なる少なくとも2種以上を用いる。

【0037】ここで、式(1)における $R_1$ 、及び式(3)における $R_3$ 、即ちフェニル構造、チエニル構造の少なくとも1種を有する残基としては、下記式(5)～(15)で表される残基または残基群に含まれるものを好ましい具体例として挙げることができ、これらの少なくとも1種を式(1)における $R_1$ 、及び式(3)における $R_3$ として用いることができる。式(5)：

【0038】

【化35】

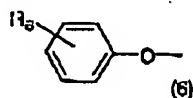


(5)

【0039】(式中、 $R_5$ は芳香環への置換基を示し、 $R_5$ はH原子、ハロゲン原子、CN基、 $\text{NO}_2$ 基、 $\text{CH}_3$ 基、 $\text{C}_2\text{H}_5$ 基、 $\text{C}_3\text{H}_7$ 基、 $\text{CH}=\text{CH}_2$ 基、 $\text{COOR}_{51}$  ( $R_{51}$ はH原子、Na原子、K原子のいずれかを表し、 $R_1$ の場合のみ選択される。)、 $\text{CF}_3$ 基、 $\text{C}_2\text{F}_5$ 基、 $\text{C}_3\text{F}_7$ 基から選択された少なくとも一種である。)で示される無置換または置換フェニル基群；式(6)：

【0040】

【化36】

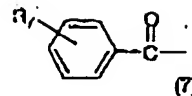


(6)

【0041】(式中、 $R_6$ は芳香環への置換基を示し、 $R_6$ はH原子、ハロゲン原子、CN基、 $\text{NO}_2$ 基、 $\text{CH}_3$ 基、 $\text{C}_2\text{H}_5$ 基、 $\text{C}_3\text{H}_7$ 基、 $\text{SCH}_3$ 基、 $\text{CF}_3$ 基、 $\text{C}_2\text{F}_5$ 基、 $\text{C}_3\text{F}_7$ 基から選択された少なくとも一種である。)で示される無置換または置換フェノキシ基群；式(7)：

【0042】

【化37】

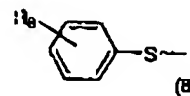


(7)

【0043】(式中、 $R_7$ は芳香環への置換基を示し、 $R_7$ はH原子、ハロゲン原子、CN基、 $\text{NO}_2$ 基、 $\text{CH}_3$ 基、 $\text{C}_2\text{H}_5$ 基、 $\text{C}_3\text{H}_7$ 基、 $\text{CF}_3$ 基、 $\text{C}_2\text{F}_5$ 基、 $\text{C}_3\text{F}_7$ 基から選択された少なくとも一種である。)で示される無置換または置換ベンゾイル基群；式(8)：

【0044】

【化38】

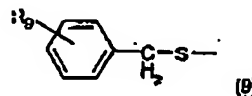


(8)

【0045】(式中、 $R_8$ は芳香環への置換基を示し、 $R_8$ はH原子、ハロゲン原子、CN基、 $\text{NO}_2$ 基、 $\text{COO}$   $R_{81}$  ( $R_{81}$ はH原子、Na原子、K原子、 $\text{CH}_3$ 基、 $\text{C}_2\text{H}_5$ 基のいずれかを表す。)、 $\text{SO}_2 R_{82}$  ( $R_{82}$ はOH基、ONa基、OK基、ハロゲン原子、 $\text{OCH}_3$ 基、 $\text{OC}_2\text{H}_5$ のいずれかを表す。)、 $\text{CH}_3$ 基、 $\text{C}_2\text{H}_5$ 基、 $\text{C}_3\text{H}_7$ 基、 $(\text{CH}_3)_2\text{-CH}$ 基、 $(\text{CH}_3)_3\text{-C}$ 基から選択された少なくとも一種である。)で示される無置換または置換フェニルスルファニル基群；式(9)：

【0046】

【化39】

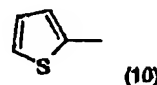


(9)

【0047】(式中、 $R_9$ は芳香環への置換基を示し、 $R_9$ はH原子、ハロゲン原子、CN基、 $\text{NO}_2$ 基、 $\text{COO}$   $R_{91}$  ( $R_{91}$ はH原子、Na原子、K原子、 $\text{CH}_3$ 基、 $\text{C}_2\text{H}_5$ 基のいずれかを表す。)、 $\text{SO}_2 R_{92}$  ( $R_{92}$ はOH基、ONa基、OK基、ハロゲン原子、 $\text{OCH}_3$ 基、 $\text{OC}_2\text{H}_5$ のいずれかを表す。)、 $\text{CH}_3$ 基、 $\text{C}_2\text{H}_5$ 基、 $\text{C}_3\text{H}_7$ 基、 $(\text{CH}_3)_2\text{-CH}$ 基、 $(\text{CH}_3)_3\text{-C}$ 基から選択された少なくとも一種である。)で示される無置換または置換(フェニルメチル)スルファニル基群；式(10)：

【0048】

【化40】



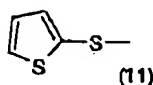
(10)

【0049】で示される2-チエニル基；式(11)：

【0050】

【化41】

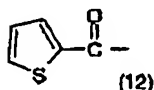
(特 0) 103-319792 (P2003-319792A)



【0051】で示される2-チエニルスルファニル基；式(12)；

【0052】

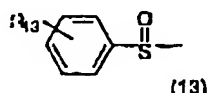
【化42】



【0053】で示される2-チエニルカルボニル基；式(13)；

【0054】

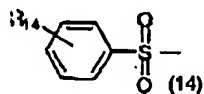
【化43】



【0055】(式中、 $R_{13}$ は芳香環への置換基を示し、 $R_{13}$ はH原子、ハロゲン原子、CN基、 $\text{NO}_2$ 基、 $\text{COOR}_{131}$  ( $R_{131}$ はH原子、Na原子、K原子、 $\text{CH}_3$ 基、 $\text{C}_2\text{H}_5$ 基のいずれかを表す)、 $\text{SO}_2\text{R}_{132}$  ( $R_{132}$ はOH基、ONa基、OK基、ハロゲン原子、 $\text{OCH}_3$ 基、 $\text{OC}_2\text{H}_5$ のいずれかを表す)、 $\text{CH}_3$ 基、 $\text{C}_2\text{H}_5$ 基、 $\text{C}_3\text{H}_7$ 基、 $(\text{CH}_3)_2\text{-CH}$ 基、 $(\text{CH}_3)_3\text{-C}$ 基から選択された少なくとも一種である。)で示される $R_1$ の場合のみ選択される無置換または置換フェニルスルフィニル基群；式(14)；

【0056】

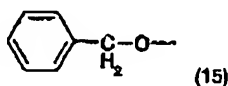
【化44】



【0057】(式中、 $R_{14}$ は芳香環への置換基を示し、 $R_{14}$ はH原子、ハロゲン原子、CN基、 $\text{NO}_2$ 基、 $\text{COOR}_{141}$  ( $R_{141}$ はH原子、Na原子、K原子、 $\text{CH}_3$ 基、 $\text{C}_2\text{H}_5$ 基のいずれかを表す)、 $\text{SO}_2\text{R}_{142}$  ( $R_{142}$ はOH基、ONa基、OK基、ハロゲン原子、 $\text{OCH}_3$ 基、 $\text{OC}_2\text{H}_5$ のいずれかを表す)、 $\text{CH}_3$ 基、 $\text{C}_2\text{H}_5$ 基、 $\text{C}_3\text{H}_7$ 基、 $(\text{CH}_3)_2\text{-CH}$ 基、 $(\text{CH}_3)_3\text{-C}$ 基から選択された少なくとも一種である。)で示される $R_1$ の場合のみ選択される無置換または置換フェニルスルホニル基群；及び、式(15)；

【0058】

【化45】



【0059】で示される(フェニルメチル)オキシ基。

【0060】なお、上記式(5)における $R_5$ 、上記式(6)における $R_6$ 、上記式(7)における $R_7$ 、上記式(8)における $R_8$ 、上記式(9)における $R_9$ 、上記式(13)における $R_{15}$ 、及び上記式(14)における $R_{16}$ は、芳香環への置換基を示すものであり、その芳香環への置換基は全てが同一であっても、少なくとも2個の置換基間で異なるものであってもよい。

【0061】また、上記式(5)の $R_5$ として $\text{COOR}_{61}$  ( $R_{61}$ はH原子、Na原子、K原子のいずれかを表す。)が選択された置換フェニル基、式(13)で示される無置換または置換フェニルスルフィニル基、式(14)で示される無置換または置換フェニルスルホニル基は、これらの残基に変換可能な残基を含むPHAを合成後に、適切な変換によって合成するのが好ましい。

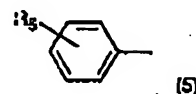
【0062】また、上記式(17)における $R_2$ は、シクロヘキシル基への置換基を示すものであり、そのシクロヘキシル基への置換基は全てが同一であっても、少なくとも2個の置換基間で異なるものであってもよい。

【0063】上記式(16)あるいは(17)で示される少なくとも1種類のユニットを分子中に含むポリヒドロキシアルカノエートは、式(16)で示されるユニットのみ有する、式(17)で示されるユニットのみ有する、式(16)で示されるユニットと式(17)で示されるユニットの両方を有する、のいずれでもよい。また、上記のポリヒドロキシアルカノエートが、式(16)で示される2以上のユニットを有する場合には、その全てのユニットのm及び $R_1$ が同一であっても、少なくとも2個のユニット間でm及び $R_1$ の少なくとも一方が異なるものが存在してもよい。同様に、上記のポリヒドロキシアルカノエートが、式(17)で示される2以上のユニットを有する場合には、その全てのユニットのk及び $R_2$ が同一であっても、少なくとも2個のユニット間でk及び $R_2$ の少なくとも一方が異なるものが存在してもよい。

【0064】式(16)における $R_1$ 、即ちフェニル構造、チエニル構造の少なくとも1種を有する残基としては、下記式(5)～(15)で表される残基または残基群に含まれるものを好ましい具体例として挙げることができる。式(5)；

【0065】

【化46】



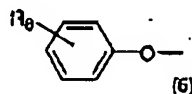
【0066】(式中、 $R_5$ は芳香環への置換基を示し、 $R_5$ はH原子、ハロゲン原子、CN基、 $\text{NO}_2$ 基、 $\text{CH}_3$ 基、 $\text{C}_2\text{H}_5$ 基、 $\text{C}_3\text{H}_7$ 基、 $\text{CH}=\text{CH}_2$ 基、 $\text{COOR}_{51}$  ( $R_{51}$ はH原子、Na原子、K原子のいずれかを表

(41) 103-319792 (P2003-319792A)

す。)、 $\text{CF}_3$ 基、 $\text{C}_2\text{F}_5$ 基、 $\text{C}_3\text{F}_7$ 基から選択された少なくとも一種である。)で示される無置換または置換フェニル基群;式(6):

【0067】

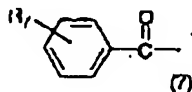
【化47】



【0068】(式中、 $R_6$ は芳香環への置換基を示し、 $R_6$ はH原子、ハロゲン原子、CN基、 $\text{NO}_2$ 基、 $\text{CH}_3$ 基、 $\text{C}_2\text{H}_5$ 基、 $\text{C}_3\text{H}_7$ 基、 $\text{SCH}_3$ 基、 $\text{CF}_3$ 基、 $\text{C}_2\text{F}_5$ 基、 $\text{C}_3\text{F}_7$ 基から選択された少なくとも一種である。)で示される無置換または置換フェノキシ基群;式(7):

【0069】

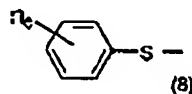
【化48】



【0070】(式中、 $R_7$ は芳香環への置換基を示し、 $R_7$ はH原子、ハロゲン原子、CN基、 $\text{NO}_2$ 基、 $\text{CH}_3$ 基、 $\text{C}_2\text{H}_5$ 基、 $\text{C}_3\text{H}_7$ 基、 $\text{CF}_3$ 基、 $\text{C}_2\text{F}_5$ 基、 $\text{C}_3\text{F}_7$ 基から選択された少なくとも一種である。)で示される無置換または置換ベンゾイル基群;式(8):

【0071】

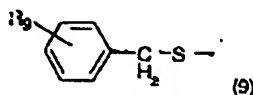
【化49】



【0072】(式中、 $R_8$ は芳香環への置換基を示し、 $R_8$ はH原子、ハロゲン原子、CN基、 $\text{NO}_2$ 基、 $\text{COO}$ 基、 $R_{91}$ ( $R_{91}$ はH原子、Na原子、K原子、 $\text{CH}_3$ 基、 $\text{C}_2\text{H}_5$ 基のいずれかを表す。)、 $\text{SO}_2\text{R}_{92}$ ( $R_{92}$ はOH基、ONa基、OK基、ハロゲン原子、 $\text{OCH}_3$ 基、 $\text{OC}_2\text{H}_5$ のいずれかを表す。)、 $\text{CH}_2$ 基、 $\text{C}_2\text{H}_5$ 基、 $\text{C}_3\text{H}_7$ 基、 $(\text{CH}_3)_2\text{-CH}$ 基、 $(\text{CH}_3)_3\text{-C}$ 基から選択された少なくとも一種である。)で示される無置換または置換フェニルスルファニル基群;式(9):

【0073】

【化50】

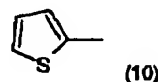


【0074】(式中、 $R_9$ は芳香環への置換基を示し、 $R_9$ はH原子、ハロゲン原子、CN基、 $\text{NO}_2$ 基、 $\text{COO}$ 基、 $R_{91}$ ( $R_{91}$ はH原子、Na原子、K原子、 $\text{CH}_3$ 基、 $\text{C}_2\text{H}_5$ 基のいずれかを表す。)、 $\text{SO}_2\text{R}_{92}$ ( $R_{92}$ はOH基、ONa基、OK基、ハロゲン原子、 $\text{OCH}_3$ 基、 $\text{OC}_2\text{H}_5$ のいずれかを表す。)、 $\text{CH}_2$ 基、 $\text{C}_2\text{H}_5$ 基、 $\text{C}_3\text{H}_7$ 基、 $(\text{CH}_3)_2\text{-CH}$ 基、 $(\text{CH}_3)_3\text{-C}$ 基から選択された少なくとも一種である。)で示される無置換または置換フェニルスルフィニル基群;式(10):

$\text{H}_5$ 基のいずれかを表す)、 $\text{SO}_2\text{R}_{92}$ ( $R_{92}$ はOH基、ONa基、OK基、ハロゲン原子、 $\text{OCH}_3$ 基、 $\text{OC}_2\text{H}_5$ のいずれかを表す。)、 $\text{CH}_2$ 基、 $\text{C}_2\text{H}_5$ 基、 $\text{C}_3\text{H}_7$ 基、 $(\text{CH}_3)_2\text{-CH}$ 基、 $(\text{CH}_3)_3\text{-C}$ 基から選択された少なくとも一種である。)で示される無置換または置換(フェニルメチル)スルファニル基群;式(10):

【0075】

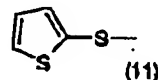
【化51】



【0076】で示される2-チエニル基;式(11):

【0077】

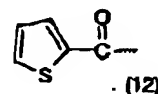
【化52】



【0078】で示される2-チエニルスルファニル基;式(12):

【0079】

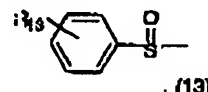
【化53】



【0080】で示される2-チエニルカルボニル基;式(13):

【0081】

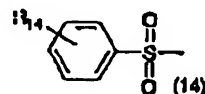
【化54】



【0082】(式中、 $R_{10}$ は芳香環への置換基を示し、 $R_{10}$ はH原子、ハロゲン原子、CN基、 $\text{NO}_2$ 基、 $\text{COOR}_{101}$ ( $R_{101}$ はH原子、Na原子、K原子、 $\text{CH}_3$ 基、 $\text{C}_2\text{H}_5$ 基のいずれかを表す。)、 $\text{SO}_2\text{R}_{102}$ ( $R_{102}$ はOH基、ONa基、OK基、ハロゲン原子、 $\text{OCH}_3$ 基、 $\text{OC}_2\text{H}_5$ のいずれかを表す。)、 $\text{CH}_2$ 基、 $\text{C}_2\text{H}_5$ 基、 $\text{C}_3\text{H}_7$ 基、 $(\text{CH}_3)_2\text{-CH}$ 基、 $(\text{CH}_3)_3\text{-C}$ 基から選択された少なくとも一種である。)で示される無置換または置換フェニルスルフィニル基群;式(14):

【0083】

【化55】



【0084】(式中、 $R_{11}$ は芳香環への置換基を示し、 $R_{11}$ はH原子、ハロゲン原子、CN基、 $\text{NO}_2$ 基、 $\text{COOR}_{111}$ ( $R_{111}$ はH原子、Na原子、K原子、 $\text{CH}_3$ 基、 $\text{C}_2\text{H}_5$ 基のいずれかを表す。)、 $\text{SO}_2\text{R}_{112}$ ( $R_{112}$ はOH基、ONa基、OK基、ハロゲン原子、 $\text{OCH}_3$ 基、 $\text{OC}_2\text{H}_5$ のいずれかを表す。)、 $\text{CH}_2$ 基、 $\text{C}_2\text{H}_5$ 基、 $\text{C}_3\text{H}_7$ 基、 $(\text{CH}_3)_2\text{-CH}$ 基、 $(\text{CH}_3)_3\text{-C}$ 基から選択された少なくとも一種である。)で示される無置換または置換フェニルスルフィニル基群;式(15):

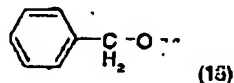


(2) 03-319792 (P2003-319792A)

基、 $C_2H_5$ 基のいずれかを表す)、 $SO_2R_{142}$  ( $R_{142}$ はOH基、ONa基、OK基、ハロゲン原子、 $OCH_3$ 基、 $OC_2H_5$ のいずれかを表す)、 $CH_3$ 基、 $C_2H_5$ 基、 $C_3H_7$ 基、 $(CH_3)_2-CH$ 基、 $(CH_3)_3-C$ 基から選択された少なくとも一種である。)で示される無置換または置換フェニルスルホニル基群; 及び、式(15):

【0085】

【化56】



【0086】で示される(フェニルメチル)オキシ基、【0087】なお、上記式(5)における $R_5$ 、上記式(6)における $R_6$ 、上記式(7)における $R_7$ 、上記式(8)における $R_8$ 、上記式(9)における $R_9$ 、上記式(13)における $R_{13}$ 、及び上記式(14)における $R_{14}$ は、芳香環への置換基を示すものであり、その芳香環への置換基は全てが同一であっても、少なくとも2個の置換基間と異なるものであってもよい。

【0088】本発明における水酸基を有する化合物としては、アルコール類、ジオール類、トリオール類、アルキレングリコール類、ポリエチレングリコール類、ポリエチレンオキサイド類、アルキレングリコールモノエステル類、ポリエチレングリコールモノエステル類及びポリエチレンオキサイドモノエステル類化合物から選ばれる少なくとも1種類を用いることができる。これらを分子制御剤として用いることで、微生物によるポリマー生成における効果的な分子制御を行うことを可能となる。

【0089】上記アルコール類、ジオール類及びトリオール類化合物としては、炭素数3から14の直鎖状及び分岐状のものが好ましい。

【0090】上記アルキレングリコール類及びアルキレングリコールモノエステル類化合物としては、その炭素鎖が、炭素数2から10の直鎖状及び分岐状構造を有しているものが好ましい。

【0091】上記ポリエチレングリコール類、ポリエチレンオキサイド類、ポリエチレングリコールモノエステル類及びポリエチレンオキサイドモノエステル類化合物の数平均分子量は100から20000の範囲であることが好ましい。

【0092】PHAのより低分子側での制御の際に用いる分子制御剤の分子量としては100から500程度のものがよいが、PHA生産微生物にとって増殖やPHA生産に対し阻害効果を有する場合、或いはPHA生産微生物により代謝され所望のPHA分子量制御効果を発揮し得ない場合があるので注意が必要である。

【0093】この場合特に効果の高い化合物を挙げれば、ポリエチレングリコール200(PEG200)、

ブタノール、1,2-ブタンジオール、1,4-ブタンジオール、1,6-ヘキサジオール、1,2,3-ブタントリオール、エチレングリコール、エチレングリコールモノメチルエーテルを挙げることができる。

【0094】また、より高分子側でのPHA分子量制御の際に用いる分子制御剤の分子量は500から2000程度のものが好ましく、具体的には平均分子量が600から2000の範囲のポリエチレングリコール(PEG600からPEG2000)を挙げることができる。

【0095】前記分子制御剤によるPHAの分子量制御機構は以下の通りである。即ち、通常のPHA生産に於いては、モノマーユニット前駆体である3-ヒドロキシシアシルCoAが、PHA合成酵素であるPHAシントーゼの触媒活性部位システインのチオール基とチオエステル結合により共有結合を形成し(酵素-3-ヒドロキシシアシルチオエステル)、更に近傍の一分子のチオール基とチオエステル結合により共有結合を形成した3-ヒドロキシシアシルCoA(酵素-3-ヒドロキシシアシルチオエステル)の水酸基と、チオエステル部分が反応することによりエステル結合が生じPHAの伸長反応が進み、この反応が繰り返されることにより結果としてポリマーが合成される。この様な系に水酸基を有する遊離の前記分子制御剤が存在した場合には、前記分子制御剤の水酸基と酵素-3-ヒドロキシシアシルチオエステルのチオエステル部分が反応してエステル結合を生じた時点で酵素から遊離することになり、結果としてその時点でPHAの伸長反応は停止することになる。

【0096】この様な、水酸基を有する化合物の濃度は、微生物培養の際の培地に対して0.01%から10%(質量/容量)、更に好ましくは0.02%から5%(質量/容量)を添加することがよく、添加時期は培養初期に一括して添加する方法、培養期間内に数回に分けて培地中に添加する方法のいずれでも良い。

【0097】本発明における微生物は、上に述べたように、上記式(3)あるいは上記式(4)で示される少なくとも1種類の化合物からポリヒドロキシアルカノエートを生産する能力を有する微生物である。

【0098】上記微生物を用いることは本発明にとって非常な構成要件である。つまり、先に「従来の技術」の項で述べた、米国特許6,156,852(特許文献2)、Biotechnology and Bioengineering, 62, 106-113(1999)(非特許文献11)、及びInternational Journal of Biological Macromolecules, 25, 43-53(1999)(非特許文献12)に開示された技術で用いる微生物は、この様な性質、即ち、式(3)あるいは式(4)で示される少なくとも1種類の化合物からポリヒドロキシアルカノエートを生産する能力を有さないからである。

(43) 103-319792 (P2003-319792A)

【0099】これらの特許公報及び化学文献に示される微生物は、通常ポリ 3-ヒドロキシ酪酸（以下PHBと記す）、ポリ 3-ヒドロキシ吉草酸（以下PHVと記す）のホモポリマー或いはこれらのコポリマーを生産することが報告されているが、PHBに代表される生合成経路は

- ① アセチルCoA→アセトアセチルCoA
- ② アセトアセチルCoA→3-ヒドロキシブチリルCoA
- ③ 3-ヒドロキシブチリルCoA→ポリ 3-ヒドロキシ酪酸

で示される。

【0100】一方本発明の方法に用いる微生物は、式(3)あるいは式(4)で示される少なくとも1種類の化合物が「 $\beta$ 酸化経路」と呼ばれる脂肪酸分解経路に導入され、以下のような変換を受けてポリヒドロキシアルカノエートを生合成する。即ち、

<1> 式(3)あるいは式(4)で示される少なくとも1種類の化合物→アシルCoA

<2> アシルCoA→エノイルCoA

<3> エノイルCoA→3-ヒドロキシアシルCoA

<4> 3-ヒドロキシアシルCoA→ポリヒドロキシアルカノエート

に示す経路によりポリマーが生合成される。かかる生合成経路に対して本発明の分子量制御剤を用いる方法が適用できる。

【0101】更にはポリヒドロキシアルカノエートの合成を直接司る酵素は、上記④の工程で用いられるものはPHBシンターゼ或いはshort-chain-length PHAシンターゼであるのに対し、本発明の<4>工程で用いられるものはPHAシンターゼ或いはmedium-chain-length PHAシンターゼであり、基質特異性が異なった別種の酵素であることが知られている。これらのことは、FEMS Microbiology Reviews, 103, 217-230 (1992) (非特許文献13)やJournal of Biotechnology, 65, 127-161 (1998) (非特許文献14)等の総説論文に詳しく記載されている。

【0102】つまり、先の「従来の技術」の項における米国特許6,156,852 (特許文献2)、Biotechnology and Bioengineering, 62, 106-113 (1999) (非特許文献11)及びInternational Journal of Biological Macromolecules, 25, 43-53 (1999) (非特許文献12)に開示された技術中で用いられる微生物と、本発明の方法で使用する微生物とは全く異なっている。この点、本発明の方法で使用する微生物としては、式(3)あるいは式(4)で示される少なくとも1

種類の化合物からポリヒドロキシアルカノエートを生産する能力を有する微生物であれば如何なる微生物であっても良いが、その中でも特にシュードモナス (*Pseudomonas*) 属に属する微生物が望ましく、更に詳しくはシュードモナス チコリアイ (*Pseudomonas cichorii*)、シュードモナス プチダ (*Pseudomonas putida*)、シュードモナス フルオレセンス (*Pseudomonas fluorescense*)、シュードモナス オレオボラン (*Pseudomonas oleovorans*)、シュードモナス アルギノーサ (*Pseudomonas aeruginosa*)、シュードモナス スツツェリ (*Pseudomonas stutzeri*)、シュードモナス ジェッセニイ (*Pseudomonas jessenii*) 等が望ましい。更に詳しくは、さらに詳しくは、シュードモナス チコリアイ YN2株 (*Pseudomonas cichorii* YN2; FERM BP-7375)、シュードモナス チコリアイ H45株 (*Pseudomonas cichorii* H45, FERM BP-7374)、シュードモナス ジェッセニイ P161株 (*Pseudomonas jessenii* P161, FERM BP-7376)、シュードモナス プチダ P91株 (*Pseudomonas putida* P91, FERM BP-7373) が挙げられる。これら4種の微生物は独立行政法人 産業技術総合研究所特許生物寄託センターに寄託されており、特開2001-288256号公報 (特許文献3) に記載されている微生物である。なお、微生物は2種以上を混合して用いることもできる。

【0103】本発明の方法における微生物の培養条件は、以下のとおりである。リン酸緩衝液及びアンモニウム塩或いは硝酸塩を基とした無機塩培地に、以下に示すように種々の必要基質及び栄養素等を加える。まず、目的とするポリヒドロキシアルカノエートを生産するための基質として、上記式(3)あるいは式(4)で示される少なくとも1種類の化合物を培地あたり0.01%から1% (質量/容量)、更に好ましくは0.02%から0.2% (質量/容量) の割合で含有していることが望ましい。

【0104】微生物増殖のための炭素源及び窒素源、ポリヒドロキシアルカノエート生産のためのエネルギー供給源として、以下の共存基質を、通常培地あたり0.1%から5% (質量/容量)、更に好ましくは0.2%から2% (質量/容量) の割合で含有していることが望ましい。

共存基質:

・天然培地成分: 酵母エキス、肉エキス、麦芽エキス、カザミノ酸、カゼイン加水分解物、ポリペプトン、トリプトン、ペプトン等。

・糖類: グリセロール、エリスロース、アラビノ

(4) 03-319792 (P2003-319792A)

ース、キシロース、グルコース、ガラクトース、マンノース、フルクトースといったアルドース、グリセロール、エリスリトール、キシリトール等のアルジトール、グルコン酸等のアルドン酸、グルクロン酸、ガラクトツロン酸等のアロン酸、マルトース、スクロース、ラクトースといった二糖等。

・有機酸或いはその塩：ヒルビン酸、リンゴ酸、乳酸、クエン酸、コハク酸、オキサロ酢酸、イソクエン酸、ケトグルタル酸、フマル酸或いはその塩等。

・アミノ酸：グルタミン酸、アスパラギン酸或いはその塩等。

・アルカン酸：炭素数4から12の直鎖或いは分岐アルカン酸等。

【0105】本発明で用いる培地としては、リン酸塩及びアンモニウム塩或いは硝酸塩等の窒素源を含む無機塩培地ならいかなる培地でも良いが、窒素源の濃度を調節することでPHAの生産性を向上せしめることが可能である。

【0106】培養温度としては上記の菌株が良好に増殖可能な温度であれば良く、15℃から37℃、更に好ましくは20℃から30℃程度が適当である。

【0107】培養は、液体培養、固体培養等、該微生物が増殖し、PHAを生産する培養方法ならいかなる培養方法でも用いることができる。さらに、バッチ培養、フェドバッチ培養、半連続培養、連続培養等の種類も問わない。液体バッチ培養の形態としては、振とうフラスコによって振とうさせて酸素を供給する方法、ジャーファーマンターによる攪拌通気方式の酸素供給方法がある。

【0108】微生物にPHAを生産・蓄積せしめる方法としては、上に示した方法の他に、一旦十分に増殖させて後に、極化アンモニウムのような窒素源を制限した培地へ菌体を移し、目的ユニットの基質となる化合物を加えた状態で更に培養すると生産性が向上する場合がある。

【0109】本発明において、上記のように培養された微生物細胞から目的のPHAを分離する方法としては、通常行なわれている方法を適用することができる。例えば、クロロホルム、ジクロロメタン、アセトンなどの有機溶媒による抽出が最も簡便ではあるが、それ以外にジオキサン、テトラヒドロフラン、アセトニトリルが用いられる場合もある。また、有機溶媒が使用しにくい環境中においては、SDS等の界面活性剤による処理、リゾチーム等の酵素による処理、次亜塩素酸塩、アンモニア、EDTA等の薬剤による処理、或いは超音波破壊法、ホモジナイザー法、圧力破壊法、ビーズ衝撃法、摩擦法、撹拌法、凍結融解法のいずれかの方法を用いて微生物細胞を物理的に破壊することによって、PHA以外の菌体成分を除去して、PHAを回収する方法を用いることもできる。

【0110】なお、本発明の微生物の培養、本発明の微

生物によるPHAの生産と菌体への蓄積、並びに、本発明における菌体からのPHAの回収は、上記の方法に限定されるものではない。

【0111】

【実施例】実施例で用いた無機塩培地(M9培地)の組成を以下に示す。

(M9培地組成：単位g/L)

$\text{Na}_2\text{HPO}_4$  : 6.3

$\text{KH}_2\text{PO}_4$  : 3.0

$\text{NH}_4\text{Cl}$  : 1.0

$\text{NaCl}$  : 0.5

(pH=7.0)

更に、良好な増殖及びPHAの生産のために、上記の無機塩培地に培地に以下に示す微量成分溶液を0.3%

(容量/容量)程度添加した。

(微量成分溶液組成：単位g/L)

ニトリロ 三酢酸 : 1.5 ;  $\text{MgSO}_4$  : 3.0 ;  $\text{MnSO}_4$  : 0.5 ;  $\text{NaCl}$  : 1.0 ;  $\text{FeSO}_4$  : 0.1 ;  $\text{CaCl}_2$  : 0.1 ;  $\text{CoCl}_2$  : 0.1 ;  $\text{ZnSO}_4$  : 0.1 ;  $\text{CuSO}_4$  : 0.1 ;  $\text{AlK}(\text{SO}_4)_2$  : 0.1 ;  $\text{H}_3\text{BO}_3$  : 0.1 ;  $\text{Na}_2\text{MoO}_4$  : 0.1 ;  $\text{NiCl}_2$  : 0.1

(実施例1) ポリ 3-ヒドロキシ-5-フェニル吉草酸 (PHPV) のポリエチレングリコールによる分子量制御-1

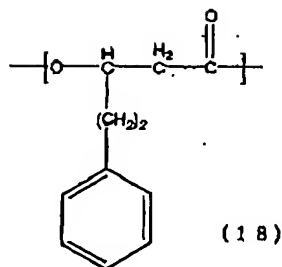
ポリペプトン(和光純薬) 0.5% (質量/容量(w/v))、5-フェニル吉草酸 0.1% (w/v) 及び分子量制御剤としてポリエチレングリコール200 (PEG200 : 平均分子量190-210 ; キシダ化学) を0%、1%、2%、5% (容量/容量(v/v)) 含むM9培地200mLに、予めポリペプトン0.5%を含むM9培地で30℃、8時間振とう培養したシュードモナス チコリアイ YN2株の培養液を1mL加え、500mL容振とうフラスコで30℃、24時間培養した。培養後、遠心分離により菌体を取扱い、メタノールで洗浄した後凍結乾燥した。乾燥菌体を秤量後、クロロホルムを加え、50℃で24時間攪拌することによりポリマーを抽出した。ポリマーが抽出されたクロロホルムをろ過し、エバポレーターにより濃縮した後、冷メタノールで沈殿固化した部分を集め、減圧乾燥して、目的とするポリマーを得た。

【0112】得られたポリマーの構造決定を、 $^1\text{H-NMR}$  (FT-NMR : Bruker DPX400 ;  $^1\text{H}$ 核磁周波数 : 400MHz ; 測定核種 :  $^1\text{H}$  ; 使用溶媒 :  $\text{CDCl}_3$  ; reference : キヤピラリ封入TMS/ $\text{CDCl}_3$  ; 測定温度 : 室温) によって行ったところ、ほぼポリ 3-ヒドロキシ-5-フェニル吉草酸 (以下PHPVと記す) のホモポリマーであった (以下の式(18))。

【0113】

【化57】

(包5) 103-319792 (P2003-319792A)



【0114】これらポリマーの分子量は、ゲルパーミエーションクロマトグラフィー（GPC）により測定した（東ソー HLC-8220 GPC、カラム：東ソー TSK-GEL SuperHM-H、溶媒：クロロホルム、ポリスチレン換算）。得られた菌体及びポリマーの重量、菌体あたりのポリマー重量比、得られたポリマーの分子量及び分子量分布を表1に示す。

【0115】

【表1】

P:G200(%)	CDW(mg/L)	PDW(mg/L)	P/C(%)	Mn	Mw/Mn
0	1238	803	49.7	92000	1.9
1	1022	523	51.1	28000	2.0
2	1007	513	50.9	18000	2.1
5	825	343	54.8	15000	2.1

【0116】CDW：菌体乾燥重量；PDW：ポリマー乾燥重量；P/C：ポリマー乾燥重量／菌体乾燥重量；Mn：数平均分子量；Mw/Mn：分子量分布（実施例2）PHPVのポリエチレングリコールによる分子量制御-2

分子量制御剤としてPEG200の替わりにPEG600（平均分子量：570-630）にした以外は実施例

1と同様の方法で実験を行った。<sup>1</sup>H-NMRにより解析した、得られたポリマーの構造は実施例1と同じくほぼPHPVホモポリマーであった。得られた菌体及びポリマーの重量、菌体あたりのポリマー重量比、得られたポリマーの分子量及び分子量分布を表2に示す。

【0117】

【表2】

PEG600(%)	CDW(mg/L)	PDW(mg/L)	P/C(%)	Mn	Mw/Mn
0	1205	800	49.8	92000	1.9
1	1100	553	48.5	70000	1.9
2	1090	533	48.9	65000	2.1
5	805	321	53.1	49000	2.0

【0118】CDW：菌体乾燥重量；PDW：ポリマー乾燥重量；P/C：ポリマー乾燥重量／菌体乾燥重量；Mn：数平均分子量；Mw/Mn：分子量分布（実施例3）PHPVのポリエチレングリコールによる分子量制御-3

分子量制御剤としてPEG200の替わりにPEG2000（平均分子量：1800-2200）にした以外は

実施例1と同様の方法で実験を行った。<sup>1</sup>H-NMRにより解析した、得られたポリマーの構造は実施例1と同じくほぼPHPVホモポリマーであった。得られた菌体及びポリマーの重量、菌体あたりのポリマー重量比、得られたポリマーの分子量及び分子量分布を表3に示す。

【0119】

【表3】

PEG2000(%)	CDW(mg/L)	PDW(mg/L)	P/C(%)	Mn	Mw/Mn
0	1225	802	49.1	92000	1.9
1	1090	819	47.6	80000	2.1
2	1070	522	48.8	87000	2.0
5	618	320	51.8	61000	1.9

【0120】CDW：菌体乾燥重量；PDW：ポリマー乾燥重量；P/C：ポリマー乾燥重量／菌体乾燥重量；Mn：数平均分子量；Mw/Mn：分子量分布

（実施例4）ポリ 3-ヒドロキシ-5-フェノキシ吉草酸のポリエチレングリコールによる分子量制御

ポリペプトン0.5%（w/v）、5-フェノキシ吉草酸0.1%（w/v）を含み、分子量制御剤としてPEG200を含まない、或いは1%（v/v）含むM9培地200mLに、予めポリペプトン0.5%を含むM9培地で30℃、8時間振とう培養したシュドモナスチコリアイ YN2株、シュドモナスプチダ P161株の培養液をそれぞれ1mL加え、500mL容振とう

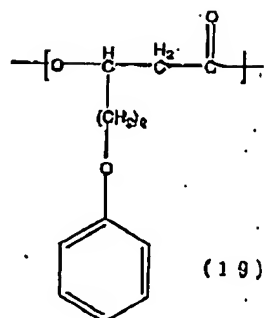
フラスコで30℃、45時間培養した。培養後、実施例1に示す方法と同様の方法で、目的とするポリマーを得た。

【0121】得られたポリマーの構造決定を、<sup>1</sup>H-NMRによって行ったところ、何れもほぼポリ 3-ヒドロキシ-5-フェノキシ吉草酸のホモポリマーであった（以下の式（19））。

【0122】

【化58】

(46) 03-319792 (P2003-319792A)



【0123】これらポリマーの分子量は、実施例1と同様にGPCにより測定した。得られた菌体及びポリマーの重量、菌体あたりのポリマー重量比、得られたポリマーの分子量及び分子量分布を表4に示す。

【0124】

【表4】

菌株	PEG200-J%	CDW(mg/L)	PDW(mg/L)	P/C(%)	Mn	Mw/Mn
YN2	含まない	760	380	47.4	225000	2.1
	含む	760	175	23.3	92000	2.0
P181	含まない	880	150	22.1	160000	1.9
	含む	530	40	7.5	40000	2.0

【0125】CDW：菌体乾燥重量；PDW：ポリマー乾燥重量；P/C：ポリマー乾燥重量／菌体乾燥重量；Mn：数平均分子量；Mw/Mn：分子量分布  
(実施例5) PHPVの各種分子量制御剤による分子量制御

ポリペプトン0.5% (w/v)、5-フェニル吉草酸0.1% (w/v) 及び分子量制御剤を含まない、或いは分子量制御剤としてPEG200、イソプロパノール(キシダ化学)、n-ブタノール(キシダ化学)を各0.1% (v/v) 含むM9培地200mLに、予めポリペプトン0.5%を含むM9培地で30℃、8時間振とう培養したシュドモナス チコリアイ YN2株の培

養液を1mL加え、500mL容振とうフラスコで30℃、40時間培養した。培養後、実施例1に示す方法と同様の方法で、目的とするポリマーを得た。

【0126】得られたポリマーの構造決定を、<sup>1</sup>H-NMRによって行ったところ、何れもほぼPHPVのホモポリマーであった。

【0127】これらポリマーの分子量は、実施例1と同様にGPCにより測定した。得られた菌体及びポリマーの重量、菌体あたりのポリマー重量比、得られたポリマーの分子量及び分子量分布を表5に示す。

【0128】

【表5】

分子量制御剤	CDW(mg/L)	PDW(mg/L)	P/C(%)	Mn	Mw/Mn
無添加	1170	785	60.3	84000	1.9
PEG200	1100	540	49.1	65000	2.1
IPA	1210	600	49.6	78000	1.9
BA	1470	635	43.2	38000	2.3

【0129】CDW：菌体乾燥重量；PDW：ポリマー乾燥重量；P/C：ポリマー乾燥重量／菌体乾燥重量；Mn：数平均分子量；Mw/Mn：分子量分布；IPA：イソプロパノール；BA：n-ブタノール  
(実施例6) ポリ3-ヒドロキシ-5-(フェニルスルファニル)吉草酸の各種分子量制御剤による分子量制御

ポリペプトン0.5%及び5-(フェニルスルファニル)吉草酸0.1%を含み、分子量制御剤を含まない、或いは分子量制御剤として1,2-ブタンジオール、1,4-ブタンジオール、1,6-ヘキサンジオール、1,2,3-ブタントリオール、エチレングリコール、エチレングリコールモノメチルエーテル各0.1% (v/v) を含むM9培地200mLに、予めポリペプトン0.5%を含むM9培地で30℃、8時間振とう培養したシュドモナス チコリアイ YN2株の培養液を1mL加え、500mL容振とうフラスコで30℃、48時

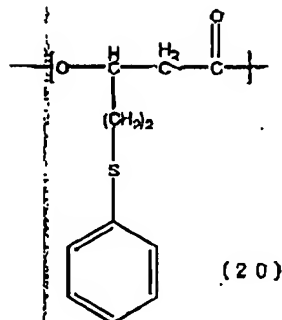
間培養した。培養後、実施例1に示す方法と同様の方法で、目的とするポリマーを得た。

【0130】得られたポリマーの構造決定を、<sup>1</sup>H-NMRによって行ったところ、何れもほぼポリ3-ヒドロキシ-5-(フェニルスルファニル)吉草酸のホモポリマーであった(以下の式(20))。

【0131】

【化59】

(特 7) 103-319792 (P2003-319792A)



【0132】これらポリマーの分子量は、実施例1と同様にGPCにより測定した。得られた菌体及びポリマーの重量、菌体あたりのポリマー重量比、得られたポリマーの分子量及び分子量分布を表6に示す。

【0133】

【表6】

分子量制御剤	CDW(mg/L)	PDW(mg/L)	P/C(%)	Mn	Mw/Mn
無添加	1210	590	48.8	150000	2.3
1,2-BD	1200	570	47.5	42000	2.2
1,3-BD	1215	585	48.5	44000	2.1
1,6-HD	1150	575	50.0	25000	2.1
1,2,3-BT	1090	505	46.3	45000	2.3
EG	1230	600	48.8	50000	2.2
MEG	1200	580	49.2	53000	2.2

【0134】CDW：菌体乾燥重量；PDW：ポリマー乾燥重量；P/C：ポリマー乾燥重量／菌体乾燥重量；Mn：数平均分子量；Mw/Mn：分子量分布；1,2-BD：1,2-ブタンジオール；1,4-BD：1,4-ブタンジオール；1,6-HD：1,6-ヘキサンジオール；1,2,3-BT：1,2,3-ブタントリオール；EG：エチレングリコール；MEG：エチレングリコールモノメチルエーテル

(実施例7) ポリ 3-ヒドロキシ-5-(2-チエニル) 吉草酸のPEGによる分子量制御  
酵母エキス(Difco) 0.5%、5-(2-チエニル) 吉草酸0.1%を含み、分子量制御剤としてPEG 200を含まない、或いは1%(v/v)含むM9培地で30℃、8時間振とう培養したシュドモナス プチダP91株の培養液をそれぞれ1mL加え、500mL容振とうフラスコで30℃、45時間培養した。培養後、実施例1に示す方法と同様の方法で、目的とするポリマーを得た。

【0135】得られたポリマーの構造決定を、<sup>1</sup>H-N

PEG200:1%	CDW(mg/L)	PDW(mg/L)	P/C(%)	Mn	Mw/Mn
含まない	600	15	2.5	72000	3.2
含む	540	15	3.0	30000	2.8

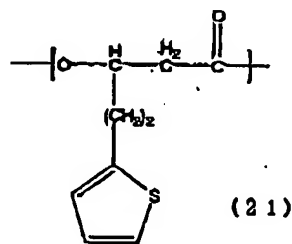
【0139】CDW：菌体乾燥重量；PDW：ポリマー乾燥重量；P/C：ポリマー乾燥重量／菌体乾燥重量；Mn：数平均分子量；Mw/Mn：分子量分布

(実施例8) ポリ 3-ヒドロキシ-5-(4-フルオロフェニル) 吉草酸のPEGによる分子量制御  
D-グルコース(キシダ化学) 0.5%、5-(4-フルオロフェニル) 吉草酸0.1%を含み、分子量制御剤としてPEG 200を含まない、或いは1%(v/v)含むM9培地で30℃、8時間振とう培養したシュドモナス チコリアイ YN2株の培養液をそれぞれ1mL加え、500mL容振とうフラスコで30℃、48時間培養した。培養後、実施例1に示す方法と同様の方法で、目的とするポリマーを得た。

MRによって行ったところ、ほぼポリ 3-ヒドロキシ-5-(2-チエニル) 吉草酸のホモポリマーであった(以下の式(21))。

【0136】

【化60】



【0137】これらポリマーの分子量は、実施例1と同様にGPCにより測定した。得られた菌体及びポリマーの重量、菌体あたりのポリマー重量比、得られたポリマーの分子量及び分子量分布を表7に示す。

【0138】

【表7】

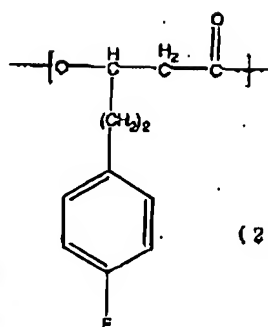
を含むM9培地で30℃、8時間振とう培養したシュドモナス チコリアイ YN2株の培養液をそれぞれ1mL加え、500mL容振とうフラスコで30℃、48時間培養した。培養後、実施例1に示す方法と同様の方法で、目的とするポリマーを得た。

【0140】得られたポリマーの構造決定を、<sup>1</sup>H-NMRによって行ったところ、ほぼポリ 3-ヒドロキシ-5-(4-フルオロフェニル) 吉草酸のホモポリマーであった(以下の式(22))。

(包S) 03-319792 (P2003-319792A)

【0141】

【化61】



(22)

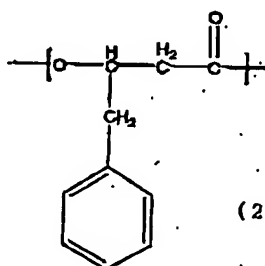
PEG200:1%	CDW(mg/L)	PDW(mg/L)	P/C(%)	Mn	Mw/Mn
含まない	790	430	54.4	90000	2.1
含む	700	390	65.7	22000	2.0

【0144】CDW: 菌体乾燥重量; PDW: ポリマー乾燥重量; P/C: ポリマー乾燥重量/菌体乾燥重量; Mn: 数平均分子量; Mw/Mn: 分子量分布

(実施例9) ポリ 3-ヒドロキシ-4-フェニル酪酸、及びポリ 3-ヒドロキシ-6-フェニルヘキサン酸のPEGによる分子量制御  
ポリマー合成基質を4-フェニル酪酸及び6-フェニルヘキサン酸に変更した以外は実施例8と同様の方法でPEG200の分子量制御効果を評価した。得られたポリマーの構造決定を、<sup>1</sup>H-NMRによって行ったところ、それぞれほぼポリ 3-ヒドロキシ-4-フェニル酪酸(以下の式(23))及び3-ヒドロキシ-6-フェニルヘキサン酸(以下の式(24))のホモポリマーであった。

【0145】

【化62】



(23)

ポリマー	PEG200:1%	CDW(mg/L)	PDW(mg/L)	P/C(%)	Mn	Mw/Mn
PIPB	含まない	420	66	15.7	78000	2.2
	含む	420	69	18.4	19000	2.1
PHPHx	含まない	700	72	10.3	80000	2.3
	含む	880	69	10.5	23000	2.1

【0149】PHPB: ポリ 3-ヒドロキシ-4-フェニル酪酸; PHPHx: 3-ヒドロキシ-6-フェニルヘキサン酸; CDW: 菌体乾燥重量; PDW: ポリマー乾燥重量; P/C: ポリマー乾燥重量/菌体乾燥重量

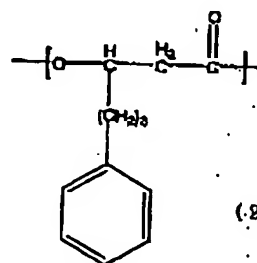
【0142】これらポリマーの分子量は、実施例1と同様にGPCにより測定した。得られた菌体及びポリマーの重量、菌体あたりのポリマー重量比、得られたポリマーの分子量及び分子量分布を表8に示す。

【0143】

【表8】

【0146】

【化63】



(24)

【0147】これらポリマーの分子量は、実施例1と同様にGPCにより測定した。得られた菌体及びポリマーの重量、菌体あたりのポリマー重量比、得られたポリマーの分子量及び分子量分布を表9に示す。

【0148】

【表9】

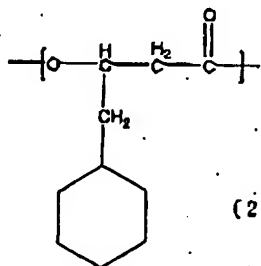
量; Mn: 数平均分子量; Mw/Mn: 分子量分布  
(実施例10) ポリ 3-ヒドロキシ-4-シクロヘキシル酪酸のPEGによる分子量制御  
増殖基質をD-グルコースからポリペプトンに変更し、

(表9) 103-319792 (P2003-319792A)

ポリマー生成基質を4-シクロヘキシル酪酸に変更して、実施例8と同様に評価した。得られたポリマーの構造決定を、<sup>1</sup>H-NMRによって行ったところ、ほぼポリ 3-ヒドロキシ-4-シクロヘキシル酪酸のホモポリマーであった(以下の式(25))。

【0150】

【化64】



(25)

P:G200:1%	CDW(mg/L)	PDW(mg/L)	P/C(%)	Mn	Mw/Mn
含まない	820	480	58.5	71000	2.2
含む	820	430	52.4	18000	2.1

【0153】CDW: 菌体乾燥重量; PDW: ポリマー乾燥重量; P/C: ポリマー乾燥重量/菌体乾燥重量; Mn: 数平均分子量; Mw/Mn: 分子量分布

(実施例11) 3-ヒドロキシ-5-フェノキシ吉草酸及び3-ヒドロキシ-5-(4-シアノフェノキシ)吉草酸ユニット含有PHAのPEGによる分子量制御ポリペプトン0.5%及び5-(4-シアノフェノキシ)吉草酸、5-フェノキシ吉草酸をそれぞれ0.05%含む、分子量制御剤としてPEG200を含まない、或いは1%(v/v)含むM9培地200mLに、予めポリペプトン0.5%を含むM9培地で30℃、8時間振とう培養したシュードモナス チコリアイ YN2株の培養液をそれぞれ1mL加え、500mL容振とうフラスコで30℃、48時間培養した。培養後、実施例1に示す方法と同様の方法で精製を行い、更にアセトン可溶成分のみを回収することで目的とするポリマーを得た。

【0154】得られたポリマーの構造決定を、<sup>1</sup>H-NMRによって行ったところ、以下の式(26)の組成式に示すユニットの割合は、A:B:C:D=2:25:5:68 (PEGを含まない系) 及び3:24:7:6

【0151】これらポリマーの分子量は、実施例1と同様にGPCにより測定した。得られた菌体及びポリマーの重量、菌体あたりのポリマー重量比、得られたポリマーの分子量及び分子量分布を表10に示す。

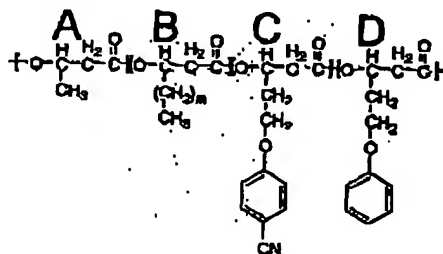
【0152】

【表10】

6 (PEGを含んだ系) である。3-ヒドロキシ-5-フェノキシ吉草酸及び3-ヒドロキシ-5-(4-シアノフェノキシ)吉草酸ユニットを含むPHAであることが示された。

【0155】

【化65】



(26)

【0156】これらポリマーの分子量は、実施例1と同様にGPCにより測定した。得られた菌体及びポリマーの重量、菌体あたりのポリマー重量比、得られたポリマーの分子量及び分子量分布を表11に示す。

【0157】

【表11】

PEG200:1%	CDW(mg/L)	PDW(mg/L)	P/C(%)	Mn	Mw/Mn
含まない	880	110	18.2	72000	2.3
含む	860	100	15.2	20000	2.1

【0158】CDW: 菌体乾燥重量; PDW: ポリマー乾燥重量; P/C: ポリマー乾燥重量/菌体乾燥重量; Mn: 数平均分子量; Mw/Mn: 分子量分布

(実施例12) 3-ヒドロキシ-5-フェノキシ吉草酸及び3-ヒドロキシ-5-(4-ニトロフェノキシ)吉草酸ユニット含有PHAのPEGによる分子量制御ポリマー生成基質のうち5-(4-シアノフェノキシ)吉草酸を5-(4-ニトロフェノキシ)吉草酸変更した

以外は実施例11と同様の方法でポリマーを得、PEGによる分子量制御効果を評価した。

【0159】得られたポリマーの構造決定を、<sup>1</sup>H-NMRによって行ったところ、以下の式(27)の組成式に示すユニットの割合は、A:B:C:D=2:22:4:72 (PEGを含まない系) 及び4:23:5:68 (PEGを含んだ系) である。3-ヒドロキシ-5-フェノキシ吉草酸及び3-ヒドロキシ-5-(4-ニ

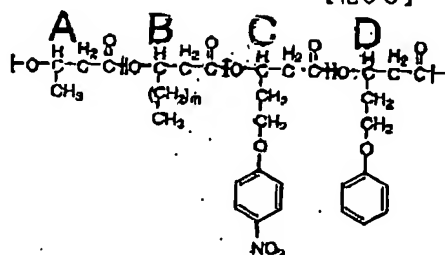


(20) 103-319792 (P2003-319792A)

ロフェノキシ) 吉草酸ユニットを含むPHAであることが示された。

【0160】

【化66】



(27)

【0161】これらポリマーの分子量は、実施例1と同様にGPCにより測定した。得られた菌体及びポリマーの重量、菌体あたりのポリマー重量比、得られたポリマ

ーの分子量及び分子量分布を表12に示す。

【0162】

【表12】

PEG200:1%	CDW(mg/L)	PDW(mg/L)	P/C(%)	Mn	Mw/Mn
含まない	580	85	15.1	70000	2.2
含む	570	80	14.0	17000	2.1

【0163】CDW: 菌体乾燥重量; PDW: ポリマー乾燥重量; P/C: ポリマー乾燥重量/菌体乾燥重量; Mn: 数平均分子量; Mw/Mn: 分子量分布

(実施例13) 3-ヒドロキシ-5-フェノキシ吉草酸、3-ヒドロキシ-7-フェノキシヘプタン酸及び3-ヒドロキシ-9-フェノキシノナン酸ユニット含有PHAのPEGによる分子量制御

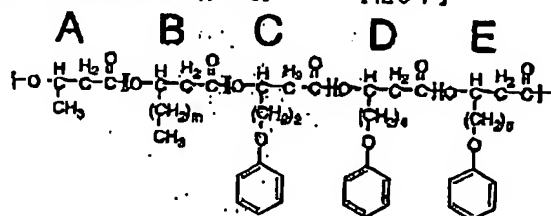
ポリマー合成基質として11-フェノキシウンデカン酸を用い、生産菌株としてシュードモナス チコリアイ H 45株を用いた以外は実施例10と同様の操作を行ってポリマーを得、PEGによる分子量制御評価を行った。

【0164】得られたポリマーの構造決定を、<sup>1</sup>H-NMRによって行ったところ、以下の式(28)の組成式に示すユニットの割合は、A:B:C:D:E=3:

1:34:51:11 (PEGを含まない系) 及び3:1:35:52:9 (PEGを含んだ系) である、3-ヒドロキシ-5-フェノキシ吉草酸、3-ヒドロキシ-7-フェノキシヘプタン酸及び3-ヒドロキシ-9-フェノキシノナン酸ユニットを含むPHAであることが示された。

【0165】

【化67】



(28)

【0166】これらポリマーの分子量は、実施例1と同様にGPCにより測定した。得られた菌体及びポリマーの重量、菌体あたりのポリマー重量比、得られたポリマ

ーの分子量及び分子量分布を表13に示す。

【0167】

【表13】

PEG200:1%	CDW(mg/L)	PDW(mg/L)	P/C(%)	Mn	Mw/Mn
含まない	820	290	35.4	33000	1.9
含む	815	280	34.4	10000	1.9

【0168】CDW: 菌体乾燥重量; PDW: ポリマー乾燥重量; P/C: ポリマー乾燥重量/菌体乾燥重量; Mn: 数平均分子量; Mw/Mn: 分子量分布

(実施例14) 3-ヒドロキシ-5-(2-チエノイル) 吉草酸ユニット含有PHAのPEGによる分子量制御

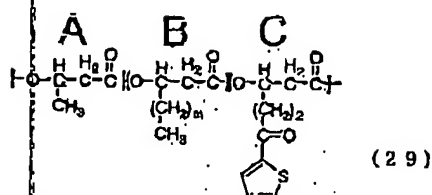
ポリマー合成基質として5-(2-チエノイル) 吉草酸を用いた以外は実施例8と同様の操作を行ってポリマーを得、PEGによる分子量制御評価を行った。

【0169】得られたポリマーの構造決定を、<sup>1</sup>H-NMRによって行ったところ、以下の式(29)の組成式に示すユニットの割合は、A:B:C=1:37:62 (PEGを含まない系) 及び1:35:64 (PEGを含んだ系) である、3-ヒドロキシ-5-(2-チエノイル) 吉草酸ユニットを含むPHAであることが示された。

【0170】

【化68】

(21) 03-319792 (P2003-319792A)

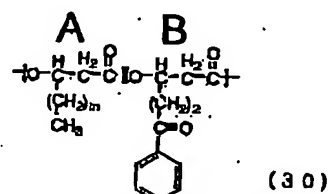


PEG200:1%	CDW(mg/L)	PDW(mg/L)	P/C(%)	Mn	Mw/Mn
含まない	870.	85	10.9	110000	2.4
含む	875.	100	11.4	45000	2.2

【0173】CDW: 菌体乾燥重量; PDW: ポリマー乾燥重量; P/C: ポリマー乾燥重量/菌体乾燥重量; Mn: 数平均分子量; Mw/Mn: 分子量分布  
(実施例15) 3-ヒドロキシ-5-ベンゾイル吉草酸ユニット含有PHAのPEGによる分子量制御  
ポリマー合成基質として5-ベンゾイル吉草酸を用いた以外は実施例8と同様の操作を行ってポリマーを得、PEGによる分子量制御評価を行った。

【0174】得られたポリマーの構造決定を、<sup>1</sup>H-NMRによって行ったところ、以下の式(30)の組成式に示すユニットの割合は、A:B:=16:84 (PEGを含まない系) 及び15:85 (PEGを含んだ系) である。3-ヒドロキシ-5-ベンゾイル吉草酸ユニットを含むPHAであることが示された。

【0175】  
【化69】



【0176】これらポリマーの分子量は、実施例1と同様にGPCにより測定した。得られた菌体及びポリマーの重量、菌体あたりのポリマー重量比、得られたポリマーの分子量及び分子量分布を表15に示す。

【0177】  
【表15】

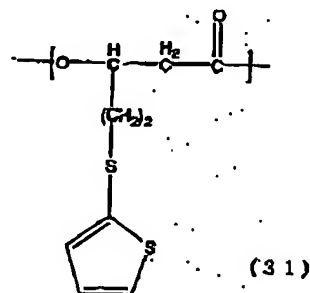
PEG200:1%	CDW(mg/L)	PDW(mg/L)	P/C(%)	Mn	Mw/Mn
含まない	660	170	20.8	330000	3.9
含む	685	180	21.1	85000	3.7

【0178】CDW: 菌体乾燥重量; PDW: ポリマー乾燥重量; P/C: ポリマー乾燥重量/菌体乾燥重量; Mn: 数平均分子量; Mw/Mn: 分子量分布  
(実施例16) 3-ヒドロキシ-5-(2-チエニルチオ)吉草酸ユニット含有PHAのPEGによる分子量制御

ポリマー合成基質として5-(2-チエニルチオ)吉草酸を用いた以外は実施例11と同様の操作を行ってポリマーを得、PEGによる分子量制御評価を行った。

【0179】得られたポリマーの構造決定を、<sup>1</sup>H-NMRによって行ったところ、以下の式(31)に示すポリ 3-ヒドロキシ-5-(2-チエニルチオ)吉草酸のほぼホモポリマーであることが示された。

【0180】  
【化70】



【0181】これらポリマーの分子量は、実施例1と同様にGPCにより測定した。得られた菌体及びポリマーの重量、菌体あたりのポリマー重量比、得られたポリマーの分子量及び分子量分布を表16に示す。

【0182】  
【表16】

PEG200:1%	CDW(mg/L)	PDW(mg/L)	P/C(%)	Mn	Mw/Mn
含まない	1100	350	31.8	198000	2.9
含む	1050	350	33.3	74000	2.6

【0183】CDW: 菌体乾燥重量; PDW: ポリマー乾燥重量; P/C: ポリマー乾燥重量/菌体乾燥重量; Mn: 数平均分子量; Mw/Mn: 分子量分布

(実施例17) 3-ヒドロキシ-5-[(フェニルメチル)スルファニル]吉草酸ユニット含有PHAのPEGによる分子量制御

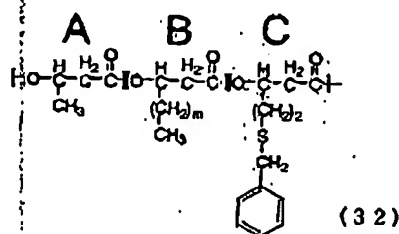
(22) 103-319792 (P2003-319792A)

ポリマー合成基質として5-[(フェニルメチル)スルファニル]吉草酸を用いた以外は実施例8と同様の操作を行ってポリマーを得、PEGによる分子量制御評価を行った。

【0184】得られたポリマーの構造決定を、 $^1\text{H-NMR}$ によって行ったところ、以下の式(32)の組成式に示すユニットの割合は、A:B:C=2:8:90 (PEGを含まない系)及び2:9:89 (PEGを含んだ系)である、3-ヒドロキシ-5-[(フェニルメチル)スルファニル]吉草酸ユニットを含むPHAであることが示された。

【0185】

【化71】



PEG200:1%	CDW(mg/L)	PDW(mg/L)	P/C(%)	Mn	Mw/Mn
含まない	980	440	44.8	15000	3.6
含む	880	400	45.4	9000	3.2

【0188】CDW: 菌体乾燥重量; PDW: ポリマー乾燥重量; P/C: ポリマー乾燥重量/菌体乾燥重量; Mn: 数平均分子量; Mw/Mn: 分子量分布

(実施例18) 3-ヒドロキシ-5-フェニル吉草酸及び3-ヒドロキシ-5-(4-ビニルフェニル)吉草酸ユニット含有PHAのPEGによる分子量制御ポリマー合成基質として5-フェニル吉草酸(0.09%)及び5-(4-ビニルフェニル)吉草酸(0.02%)を用い、クロロホルムによる抽出条件を23.5℃で72時間とした以外は実施例10と同様の操作を行ってポリマーを得、PEGによる分子量制御評価を行った。

【0189】得られたポリマーの構造決定を、 $^1\text{H-NMR}$ によって行ったところ、以下の式(33)の組成式に示すユニットの割合は、A:B:C=1:14:85 (PEGを含まない系)及び1:15:84 (PEGを含んだ系)である、3-ヒドロキシ-5-フェニル吉草酸及び3-ヒドロキシ-5-(4-ビニルフェニル)吉

【0186】これらポリマーの分子量は、実施例1と同様にGPCにより測定した。得られた菌体及びポリマーの重量、菌体あたりのポリマー重量比、得られたポリマーの分子量及び分子量分布を表17に示す。

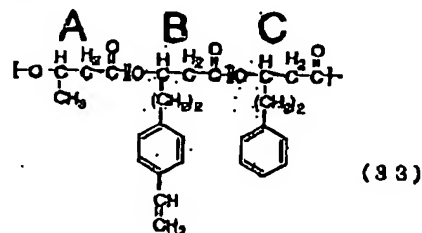
【0187】

【表17】

草酸ユニットを含むPHAであることが示された。

【0190】

【化72】



【0191】これらポリマーの分子量は、実施例1と同様にGPCにより測定した。得られた菌体及びポリマーの重量、菌体あたりのポリマー重量比、得られたポリマーの分子量及び分子量分布を表18に示す。

【0192】

【表18】

PEG200:1%	CDW(mg/L)	PDW(mg/L)	P/C(%)	Mn	Mw/Mn
含まない	1260	600	50.0	59000	2.0
含む	1150	580	50.4	18000	1.3

【0193】CDW: 菌体乾燥重量; PDW: ポリマー乾燥重量; P/C: ポリマー乾燥重量/菌体乾燥重量; Mn: 数平均分子量; Mw/Mn: 分子量分布

(実施例19) 3-ヒドロキシ-5-[(メチルスルファニル)フェノキシ]吉草酸ユニット含有PHAのPEGによる分子量制御

ポリマー合成基質として5-[(メチルスルファニル)フェノキシ]吉草酸を用いた以外は実施例10と同様の操作を行ってポリマーを得、PEGによる分子量制御評価を行った。

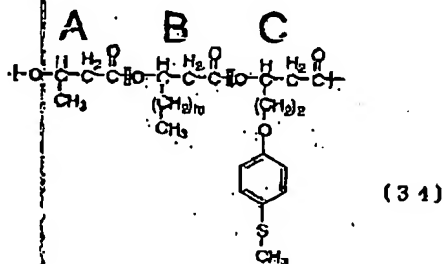
【0194】得られたポリマーの構造決定を、 $^1\text{H-NMR}$ によって行ったところ、以下の式(34)の組成式

(23) 03-319792 (P2003-319792A)

に示すユニットの割合は、A : B : C = 8 : 68 : 24 (PEGを含まない系) 及び 7 : 66 : 27 (PEGを含んだ系) である、3-ヒドロキシ-5-[(メチルスルファニル)フェノキシ]吉草酸ユニットを含むPHAであることが示された。

【0195】

【化73】



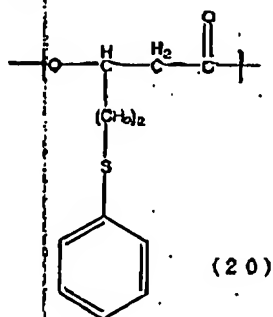
PEG200:1%	CDW(mg/L)	PDW(mg/L)	P/C(%)	Mn	Mw/Mn
含まない	990	160	15.2	16000	2.3
含む	1000	180	18.0	8000	2.1

【0198】CDW: 菌体乾燥重量; PDW: ポリマー乾燥重量; P/C: ポリマー乾燥重量/菌体乾燥重量; Mn: 数平均分子量; Mw/Mn: 分子量分布

(実施例20) 分子量制御されたポリ 3-ヒドロキシ-5-(フェニルスルファニル) 吉草酸のポリ 3-ヒドロキシ-5-(フェニルスルホニル) 吉草酸への交換  
実施例6で得られたポリ 3-ヒドロキシ-5-(フェニルスルファニル) 吉草酸のホモポリマーを(以下の式(20))、酸化処理によりポリ 3-ヒドロキシ-5-(フェニルスルホニル) 吉草酸に変換した。

【0199】

【化74】



【0200】ポリヒドロキシアルカノエート400mgを100mL容ナスフラスコ中に加え、クロロホルム10mLを加えて溶解した。これを氷浴下に置き、クロロホルム20mLに溶解したメタクロロ過安息香酸1386mgをゆっくり加えて搅拌した。75分間、氷浴下で搅拌した後、水100mL及び亜硫酸水素ナトリウムを3020mg加えた。その後、クロロホルムにより抽出を行い、ポリマーを回収した。次に、100mLエタノールを加えて、2回洗浄し、減圧乾燥することでポリマーを得た。

【0196】これらポリマーの分子量は、実施例1と同様にGPCにより測定した。得られた菌体及びポリマーの重量、菌体あたりのポリマー重量比、得られたポリマーの分子量及び分子量分布を表19に示す。

【0197】

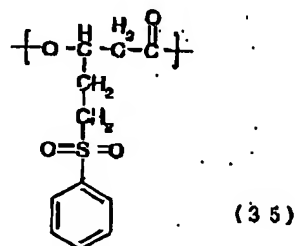
【表19】

ールを加えて、2回洗浄し、減圧乾燥することでポリマーを得た。

【0201】得られたポリマーの構造決定は、<sup>1</sup>H-NMR (FT-NMR: Bruker DPX400; 共鳴周波数: 400MHz; 測定核種: <sup>1</sup>H; 使用溶媒: CDCl<sub>3</sub>; reference: キャピラリ封入TMS/CDCl<sub>3</sub>; 測定温度: 室温)によって行った。その結果、式(35)によって示される3-ヒドロキシ-5-(フェニルスルホニル) 吉草酸のホモポリマーであることが確認された。

【0202】

【化75】



【0203】これらポリマーの分子量は、実施例1と同様にGPCにより測定した。得られたポリマーの重量、得られたポリマーの分子量及び分子量分布を表20に示す。

【0204】

【表20】

(24) 03-319792 (P2003-319792A)

分子量制御剤	重量 (mg)	Mn	Mw/Mn
無添加	375	135000	2.0
1,2-BD	365	37000	1.8
1,3-BD	368	35000	2.1
1,6-HD	384	25000	1.9
1,2,3-BT	370	42000	2.1
EG	368	48000	2.0
MEG	382	49000	2.1

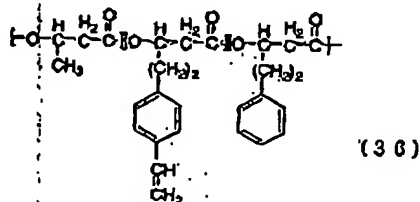
【0205】Mn：数平均分子量；Mw/Mn：分子量分布；1,2-BD：1,2-ブタンジオール；1,4-BD：1,4-ブタンジオール；1,6-HD：1,6-ヘキサンジオール；1,2,3-BT：1,2,3-ブタントリオール；EG：エチレングリコール；MEG：エチレングリコールモノメチルエーテル

(実施例21) 分子量制御された3-ヒドロキシ-5-フェニル吉草酸及び3-ヒドロキシ-5-(4-ビニルフェニル)吉草酸ユニット含有PHAの酸化処理による3-ヒドロキシ-5-フェニル吉草酸及び3-ヒドロキシ-5-(4-カルボキシフェニル)吉草酸ユニット含有PHAへの変換

実施例18で得られた3-ヒドロキシ-5-フェニル吉草酸及び3-ヒドロキシ-5-(4-ビニルフェニル)吉草酸ユニットを含むPHA(式(36))の酸化処理による3-ヒドロキシ-5-フェニル吉草酸及び3-ヒドロキシ-5-(4-カルボキシフェニル)吉草酸ユニット含有PHAへの変換を行った。

【0206】

【化76】



【0207】酸化開裂反応は以下のように行った。窒素雰囲気下、100mLフラスコに3-ヒドロキシ-ω-(4-ビニルフェニル)アルカン酸ユニットを含むポリエステル0.3g、18-クラウン-6-エーテル0.1923g、ジクロロメタン10.0mLを入れて、攪拌した。フラスコを氷浴につけて、反応系を0℃にした。30分後、過マンガン酸カリウム0.1517gを加え、アルミホイルで反応容器を包み、21時間攪拌した。反応終了後、亜硫酸水素ナトリウムを溶解させた水を加え、その反応溶液をメタノールに再沈殿させることにより、ポリマーを回収した。ここで得られたポリマーを、クロロホルムを用いて透析を行い、精製した。

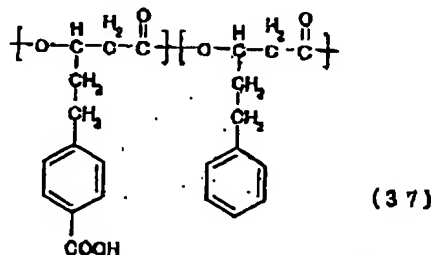
【0208】得られたポリマーの構造決定は、フーリエ変換赤外吸収(FT-IR)スペクトル(Nicolet AVATAR360 FT-IR)により分析を行った。その結果、1693cm<sup>-1</sup>に新たにカルボン酸

に由来する吸収が見られたことから、得られたPHAは3-ヒドロキシ-ω-(4-カルボキシフェニル)アルカン酸ユニットを有することが判明した。

【0209】また、得られたポリマーとトリメチルシリルジアゾメタンを反応させたものを<sup>1</sup>H-NMR(FT-NMR: Bruker DPX400; <sup>1</sup>H共鳴周波数: 400 MHz; 測定核種: <sup>1</sup>H; 使用溶媒: CDCl<sub>3</sub>; reference: キャピラリー封入TMS/CDCl<sub>3</sub>; 測定温度: 室温)によって行ったところ、下記式(37)：

【0210】

【化77】



【0211】に示すユニットを含有しているポリヒドロキシアルカノエート共重合体であることが確認された。

【0212】また、得られたポリマーとトリメチルシリルジアゾメタンを反応させたものについて、平均分子量をゲル・パーミエーション・クロマトグラフィー(GPC; 東ソーHLC-8220、カラム: 東ソーTSK-GEL Super HM-H、溶媒: クロロホルム、ポリスチレン換算)により評価した。得られたポリマーの重量、得られたポリマーの分子量及び分子量分布を表21に示す。

【0213】

【表21】

PEG200-18	重量 (mg)	Mn	Mw/Mn
含まない	285	32000	1.9
含む	278	10500	1.7

【0214】Mn：数平均分子量；Mw/Mn：分子量分布

(実施例22) 3-ヒドロキシ-5-[(フェニルメチル)オキシ]吉草酸ユニット含有PHAのPEGによる分子量制御

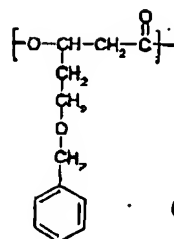
ポリマー合成基質として5-[(フェニルメチル)オキシ]吉草酸を用いた以外は実施例8と同様の操作を行ってポリマーを得、PEGによる分子量制御評価を行った。

【0215】得られたポリマーの構造決定を、<sup>1</sup>H-NMRによって行ったところ、以下の式(38)に示す3-ヒドロキシ-5-[(メチルスルファニル)フェノキシ]吉草酸ユニットのホモポリマーであることが示された。

【0216】

(25) 103-319792 (P2003-319792A)

【化78】



(98)

【0217】これらポリマーの分子量は、実施例1と同様にGPCにより測定した。得られた菌体及びポリマーの重量、菌体あたりのポリマー重量比、得られたポリマーの分子量及び分子量分布を表22に示す。

【0218】

【表22】

PEG200:1%	CDW(mg/L)	PDW(mg/L)	P/C(%)	Mn	Mw/Mn
含まない	1950	165	12.2	125000	2.4
含む	1140	125	11.0	52000	2.0

【0219】CDW：菌体乾燥重量；PDW：ポリマー乾燥重量；P/C：ポリマー乾燥重量／菌体乾燥重量；Mn：数平均分子量；Mw/Mn：分子量分布

【0220】

【発明の効果】本発明の方法により、側鎖にフェニル構

造、チオフェン構造、シクロヘキシル構造を有する残基を含むユニットを分子中に含むポリヒドロキシアルカノエートの分子量制御が可能となり、また、分子量制御されたポリヒドロキシアルカノエートの提供が可能となった。

フロントページの続き

(51)Int. Cl.

識別記号

FI

(参考)

C12R 1:38)

C12R 1:40

(C12P 11/00

C12R 1:38)

(C12P 17/00

C12R 1:40)

(72)発明者 本間 務

(72)発明者 今村 剛士

東京都大田区下丸子3丁目30番2号 キヤノン株式会社内

東京都大田区下丸子3丁目30番2号 キヤノン株式会社内

(72)発明者 須川 悦子

Fターム(参考) 4B064 AD32 AD41 AR43 AE61 B104

東京都大田区下丸子3丁目30番2号 キヤノン株式会社内

BH20 CA02 CC03 CD07 CD08

CD11 CE10 DA01 DA16

(72)発明者 福井 樹

4J029 AA02 AB01 AC01 EB01 EC10

東京都大田区下丸子3丁目30番2号 キヤノン株式会社内

ED01 ED03 EE04 EF01 EF02

**POLYESTER AND ITS PRODUCTION****Publication number:** JP2000072865**Publication date:** 1999-12-13**Inventor:** TAKAGI YASUO; YASUDA MAKOTO**Applicant:** NAGOYA CITY**Classification:**

- International: C12P7/62; C08G63/862; C08L101/16; C12N1/20; C12R1/40; C12P7/62; C08G63/00; C08L101/00; C12N1/20; (IPC1-7): C08G63/862; C12N1/20; C12P7/62; C12N1/20; C12R1/40; C12P7/62; C12R1/40

- European:

**Application number:** JP19980262447 19980831**Priority number(s):** JP19980262447 19980831

Report a data error here

**Abstract of JP2000072865**

**PROBLEM TO BE SOLVED:** To obtain a polyester capable of being decomposed in natural environment under the action of a microorganism, having high melting point and capable of possessing desirable physical properties by including a specific structural unit alone. **SOLUTION:** This polyester has only a 3-hydroxy, 5-(monofluorophenoxy) pentanoate unit of the formula as a structural unit. The polyester is obtained by incubating a microorganism belonging to *Pseudomonas* (e.g. *Pseudomonas putida* or 27 N01 strain (FERM P-16,953)) using a fatty acid (e.g. monofluorophenoxyundecanoic acid or the like) having in its molecule phenoxy groups each having one fluorine atom bound to its aromatic ring as a carbon source under the restraint of nutrient other than carbon, and usually under the conditions of pH 6-8, a temperature of 25-35 deg.C, an aeration volume of 0.5-2 vvm and an incubation time of 48-96 h.

Data supplied from the [esp@cenet](mailto:esp@cenet) database - Worldwide

(19) 日本国特許庁 (J P)

## (12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号  
特開2000-72865  
(P2000-72865A)

(43) 公開日 平成12年8月7日(2000.3.7)

(51) Int. Cl.	識別記号	F I	テコト(参考)
C 0 8 G 63/682		C 0 8 G 63/682	4 B 0 6 4
C 1 2 N 1/20		C 1 2 N 1/20	Λ 4 B 0 6 6
C 1 2 P 7/62		C 1 2 P 7/62	4 J 0 2 9
// (C 1 2 N 1/20			
C 1 2 R 1:40)			

審査請求 有 請求項の数11 F I (全 7 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願平10-262447	(71) 出願人	591270556 名古屋市 愛知県名古屋市中区三の丸3丁目1番1号
(22) 出願日	平成10年8月31日(1998.8.31)	(72) 発明者	高木 康雄 愛知県名古屋市北区上飯田北町1丁目65番
		(72) 発明者	安田 良 愛知県名古屋市中区星ヶ丘1丁目23番地の4
		(74) 代理人	399033120 加藤 厚政

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ポリエステル及びその製造方法

## (57) 【要約】

【構成】3-ヒドロキシ、5-(モノフルオロフェノキシ)ペンタノエート(3H5(MFP)P)ユニットあるいは3-ヒドロキシ、5-(ジフルオロフェノキシ)ペンタノエート(3H5(DFP)P)ユニットからなるホモポリマー、少なくとも3H5(MFP)Pユニットあるいは3H5(DFP)Pユニットを含有するコポリマー；これらのポリマーを合成するシュードモナス・フチダ；シュードモナス属を用いた前記のポリマーの製造法に関する。

【効果】置換基をもつ長鎖脂肪酸を資化して、側鎖末端が1から2個のフッ素原子が置換したフェノキシ基をもつポリマーを合成することができ、融点が高く良い加工性を保持しながら、立体規則性、撥水性を与えることができる。

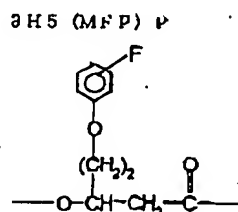


(2) 開2000-72865 (P2000-72865A)

## 【特許請求の範囲】

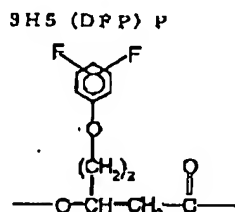
【請求項1】 3-ヒドロキシ、5-(モノフルオロフェノキシ)ペンタノエート (3H5 (MFP) P) ユニットのみになるポリエステル。

## 【化1】



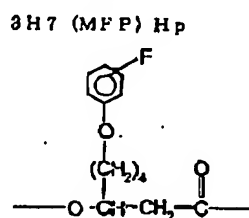
【請求項2】 3-ヒドロキシ、5-(ジフルオロフェノキシ)ペンタノエート (3H5 (DFP) P) ユニットのみになるポリエステル。

## 【化2】



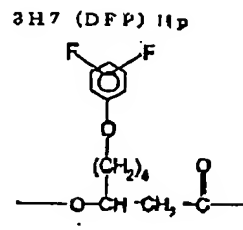
【請求項3】 3-ヒドロキシ、5-(モノフルオロフェノキシ)ペンタノエート (3H5 (MFP) P) ユニットを70モル%から99モル%、3-ヒドロキシ、7-(モノフルオロフェノキシ)ヘプタノエート (3H7 (MFP) Hp) ユニットを30モル%から1モル%含む共重合体ポリエステル。

## 【化3】



【請求項4】 3-ヒドロキシ、5-(ジフルオロフェノキシ)ペンタノエート (3H5 (DFP) P) ユニットを70モル%から99モル%、3-ヒドロキシ、7-(ジフルオロフェノキシ)ヘプタノエート (3H7 (DFP) Hp) ユニットを30モル%から1モル%含む共重合体ポリエステル。

## 【化4】

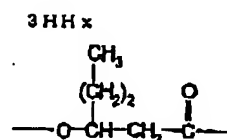


【請求項5】 少なくとも3-ヒドロキシ、5-(モノフルオロフェノキシ)ペンタノエート (3H5 (MFP) P) ユニットを含有する3成分系のモノマーユニットからなる共重合体ポリエステル。

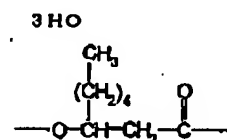
【請求項6】 少なくとも3-ヒドロキシ、5-(ジフルオロフェノキシ)ペンタノエート (3H5 (DFP) P) ユニットを含有する3成分系のモノマーユニットからなる共重合体ポリエステル。

【請求項7】 第2および第3成分として、3-ヒドロキシヘキサノエート (3HHx) ユニット、3-ヒドロキシヘプタノエート (3HHp) ユニット、3-ヒドロキシシオクタノエート (3HO) ユニット、3-ヒドロキシノナノエート (3HN) ユニットおよび3-ヒドロキシデカノエート (3HD) ユニットからなる群から選ばれた2つのユニットを有する請求項5記載の共重合ポリエステル。

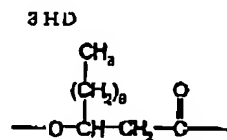
## 【化5】



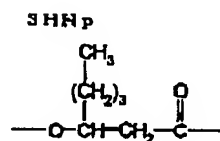
## 【化6】



## 【化7】

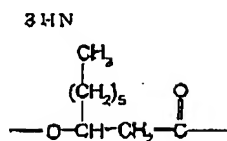


## 【化8】



## 【化9】

(3) 開2000-72865 (P2000-72865A)



【請求項8】第2および第3成分として、3-ヒドロキシヘキサノエート(3HHx)ユニット、3-ヒドロキシヘプタノエート(3HHP)ユニット、3-ヒドロキシオクタノエート(3HO)ユニット、3-ヒドロキシノナノエート(3HN)ユニットおよび3-ヒドロキシデカノエート(3HD)ユニットからなる群から選ばれる2つのユニットを有する請求項6記載の共重合ポリエステル。

【請求項9】請求項1、2、3または4に記載されたポリエステルを合成するシュードモナス・アチダ。

【請求項10】シュードモナス属の微生物を、炭素源として芳香環にフッ素原子が1個、結合しているフェノキシ基を分子内に持つ脂肪酸を用いて、炭素源以外の栄養源の制限下で培養することと特徴とする、3-ヒドロキシ、5-(モノフルオロフェノキシ)ペンタノエート(3H5(MFP)P)ユニットを有するポリエステルの製造方法

【請求項11】シュードモナス属の微生物を、炭素源として芳香環にフッ素原子が2個、結合しているフェノキシ基を分子内に持つ脂肪酸を用いて、炭素源以外の栄養源の制限下で培養することと特徴とする、3-ヒドロキシ、5-(ジフルオロフェノキシ)ペンタノエート(3H5(DFP)P)ユニットを有するポリエステルの製造方法

【発明の詳細な説明】

【0001】

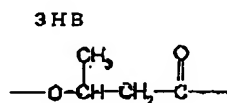
【産業上の利用分野】本発明は新規ポリエステルおよびこれを発酵合成する微生物およびその製造方法に関する。詳しくは自然環境(土中、河川、海中)の下で微生物の作用を受けて分解するプラスチック様高分子およびその製造方法に関するものである。

【0002】

【従来技術・発明が解決しようとする課題】現在まで数多くの微生物において、エネルギー貯蔵物質としてポリエステルを菌体内に蓄積することが知られている。その代表例がポリ-3-ヒドロキシブチレート(以下、P(3HB)と略す)であり、下記の式で示されるモノマーユニット(3HB)からなるホモポリマーである。

【0003】

【化10】



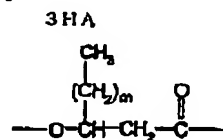
3HB

【0004】P(3HB)は確かに自然環境中で分解されるポリマーであるが、高分子材料としてみた場合、結晶性が高く、硬く、かつ脆い性質を持っており、実用的には不十分であった。これを解決するために特開昭57-150393号公報、特開昭58-69225号公報、特開昭63-269989号公報、特開昭64-48821号公報、特開平1-156320号公報、特開平5-93049号公報によればポリエステルを合成するモノマーユニットとして3HB以外の構造的に異なる炭素数が3から6のモノマーユニットを組み込むことでこのような欠点を克服することが提案されている。

【0005】また、特開昭63-229291号公報によれば、炭化水素酸化性菌であるシュードモナス・オレオボランスATCC29347に炭素数6〜12までの3-ヒドロキシアルカノエート(3HAと略す)をモノマーユニットとする共重合体P(3HA)を発酵合成できることが報告されている。このタイプの共重合体は側鎖のメチレン数が多く、性状は粘着性高分子である。

【0006】

【化11】



3HA

【0007】このように現在のところ、側鎖の鎖長を変えたタイプの共重合体が提示されている。即ち、側鎖のメチレン基数の多少による物性のコントロールである。しかしながら、微生物を使用した発酵合成では化学的な大量合成に比べると効率が悪く、一般的な汎用プラスチックのコストに対抗するのは困難であるといわれてきた。このため、機能性を併せ持つ付加価値の高いポリマーを合成できる菌株の探索が課題となっていた。

【0006】

【課題を解決するための手段】本発明者らは化学合成した自然界に存在しない脂肪酸を資化して菌体内にポリエステルを生合成し、蓄積する微生物を探索していたところ、資化効率の高い微生物を発見し、さらに研究を重ねて本発明を完成するに至った。

【0007】即ち、本発明者らの見出した微生物はフェノキシ基上にフッ素原子が1個あるいは2個置換したフェノキシアルカン酸を唯一の炭素源として生育しポリエステルを合成させる27N01株である。この微生物

(4) 開2000-72865 (P2000-72865A)

が発酵合成するポリマーのモノマーユニットを分析したところ、フッ素原子が置換した構造である3-ヒドロキシ、5- (モノフルオロフェノキシ) ペンタノエート (3H5 (MFP) Pと略す)、3-ヒドロキシ、5- (ジフルオロフェノキシ) ペンタノエート (3H5 (DFP) Pと略す)、3-ヒドロキシ、7- (モノフルオロフェノキシ) ヘプタノエート (3H7 (MFP) Hpと略す)、3-ヒドロキシ、7- (ジフルオロフェノキシ) ヘプタノエート (3H7 (DFP) Hpと略す) が完全にポリマーとなっていることがNMR分析により確認された。この微生物を同定したところ、27N01株はシュードモナス・アチダであることが判明した。

【0008】

【化12】 3H5 (MFP) P

【化13】 3H5 (DFP) P

【化14】 3H7 (MFP) Hp

【化15】 3H7 (DFP) Hp

【0009】本発明はこの微生物を見出したことに基づくものである。即ち、本発明の要旨は、(1) 3-ヒドロキシ、5- (モノフルオロフェノキシ) ペンタノエート (3H5 (MFP) P) ユニットのみになるポリエステル、(2) 3-ヒドロキシ、5- (ジフルオロフェノキシ) ペンタノエート (3H5 (DFP) P) ユニットのみになるポリエステル、(3) 3-ヒドロキシ、5- (モノフルオロフェノキシ) ペンタノエート (3H5 (MFP) P) ユニットを70モル%から99モル%、3-ヒドロキシ、7- (モノフルオロフェノキシ) ヘプタノエート (3H7 (MFP) Hp) ユニットを30モル%から1モル%含む共重合体ポリエステル、(4) 3-ヒドロキシ、5- (ジフルオロフェノキシ) ペンタノエート (3H5 (DFP) P) ユニットを70モル%から99モル%、3-ヒドロキシ、7- (ジフルオロフェノキシ) ヘプタノエート (3H7 (DFP) Hp) ユニットを30モル%から1モル%含む共重合体ポリエステル、(5) 少なくとも3-ヒドロキシ、5- (モノフルオロフェノキシ) ペンタノエート (3H5 (MFP) P) ユニットを含有する3成分系のモノマーユニットからなる共重合体ポリエステル、(6) 少なくとも3-ヒドロキシ、5- (ジフルオロフェノキシ) ペンタノエート (3H5 (DFP) P) ユニットを含有する3成分系のモノマーユニットからなる共重合体ポリエステル、(7) 第2および第3成分として、3-ヒドロ

キシヘキサノエート (3HHx) ユニット、3-ヒドロキシヘプタノエート (3HHp) ユニット、3-ヒドロキシオクタノエート (3HO) ユニット、3-ヒドロキシノナノエート (3HN) ユニットおよび3-ヒドロキシデカノエート (3HD) ユニットからなる群から選ばれる2つのユニットを有する (3H5 (MFP) P) との共重合ポリエステル、(8) 第2および第3成分として、3-ヒドロキシヘキサノエート (3HHx) ユニット、3-ヒドロキシヘプタノエート (3HHp) ユニット、3-ヒドロキシオクタノエート (3HO) ユニット、3-ヒドロキシノナノエート (3HN) ユニットおよび3-ヒドロキシデカノエート (3HD) ユニットからなる群から選ばれる2つのユニットを有する3H5 (DFP) Pとの共重合ポリエステル、(9) 前記(1)~(8)に記載されたポリエステルを合成するシュードモナス・アチダ、並びに

【0010】(10) シュードモナス属の微生物を用いる前記(1)~(9)のポリエステルの製造法に関するものである。具体的には1) シュードモナス属の微生物を、炭素源として芳香環にフッ素原子が1個、結合しているフェノキシ基を分子内に持つ脂肪酸を用いて、炭素源以外の栄養源の制限下で培養することと特徴とする、3-ヒドロキシ、5- (モノフルオロフェノキシ) ペンタノエート (3H5 (MFP) P) ユニットを有するポリエステルの製造方法、2) シュードモナス属の微生物を、炭素源として芳香環にフッ素原子が2個、結合しているフェノキシ基を分子内に持つ脂肪酸を用いて、炭素源以外の栄養源の制限下で培養することと特徴とする、3-ヒドロキシ、5- (ジフルオロフェノキシ) ペンタノエート (3H5 (DFP) P) ユニットを有するポリエステルの製造方法に関するものである。

【0011】シュードモナス属の微生物を用いた本発明のポリエステルの製造方法は、従来より報告されていない。

【0012】本発明の微生物であるシュードモナス・アチダの菌学的性質は27N01について示される表1のとおりである。このような本発明の微生物として見いだされた27N01株は名古屋市西区堀越町の土壌から分離されたものであり、27N01株は特許微生物センター；受託番号FERM P-16953号として寄託されている。

【表1】

(5) 開2000-72865 (P2000-72865A)

シュードモナス・プチダの27N-01株の菌学的性質

試験項目	試験結果
形態	桿菌
グラム染色性	-
芽胞	-
運動性	+
オキシダーゼ	+
カタラーゼ	+
OF	-
硝酸塩の還元	+
インドールの生成	-
グルコースからの酸の生成	-
アルギニンジヒドロラーゼ	+
ウレアーゼ	-
$\beta$ ガラクトシダーゼ	-
シトクロームオキシダーゼ	+
37℃での生育	+
45℃での生育	-
チロシン	+
ゲラチン	-
酸化性	
グルコース	+
アラビノース	-
マンノース	-
マンニトール	-
Nアセチルグルブサミン	-
マルトース	-
グルコン酸	+
カプロン酸	+
アジピン酸	-
マロン酸	+
クエン酸	+
フェニル酢酸	+

【0013】このような本発明のシュードモナス・プチダ27N01株は、公知の代表的なP(3HA)産生菌であるシュードモナス・オレオボランズとポリエステル生合成能力において差が見られる。即ち、ポリメラーゼの3-ヒドロキシアルカニルCoAに対する特異性であって、この27N01株は作用する基質の範囲がより広い。

【0014】本発明は前記のような性質を有するシュードモナスの微生物、及びこの微生物が発酵合成する微生物産生ポリエステル及びその製造方法を開示するものであり、フッ素基が導入されたポリエステルを作るための技術的手段を提供するものである。

【0015】即ち、具体的にはシュードモナス属の微生物に炭素源として炭素数5以上メチレン基の末端にフルオロフェノキシ基が置換した脂肪酸を炭素源として与え、炭素源以外の栄養源の制限下、通常窒素制限下で好氣的に培養するだけで目的のポリエステルを得ることができる。メチレン基のみのユニットの組成を高めたい場合は、炭素源として培養の終期に炭素数6以上の脂肪酸

を与えればよい。

【0016】このように本発明においては、シュードモナス属の微生物の特徴を利用してフェノキシ基にフッ素が置換した種々のポリエステルを発酵合成することができる。現在のところ官能基を持つポリエステルを合成できる微生物としてはシュードモナス・オレオボランズが報告されている、即ち、Macromolecules、1996、4572-4581ページによるとメチル基上に水素がフッ素に置換したカルボン酸を炭素源としてポリエステルを発酵合成した結果を報告しているが、これによれば、ポリエステルは共重合体であって、この微生物のようにホモポリマーを合成できる能力を有してはいない。

【0017】本発明の微生物を用いてポリエステルを発酵合成するには、炭素源以外の栄養源の制限下、通常、従来から知られている窒素制限条件下で培養することによって容易に得られるが、炭素源以外の必須栄養源、例えば、リン、ミネラル、ビタミン等を制限してもポリエステルは誘導される。この場合、菌体の生育が制限され

(6) 開2000-72865 (P2000-72865A)

るので、通常ポリエステル発酵合成は2段階方式でおこなわれる。

【0018】1段階目は菌体の増殖を目的とするものであり、栄養源の豊富な条件下で培養される。この際、菌体はポリエステル合成をほとんど行わないので、炭素源としては脂肪酸に限らず、資化可能であるものなら自由に選択できる。1段階目で得られた菌体を洗浄回収して2段階目において新たに炭素源を加えてポリエステルの誘導培養する。従って、この2段階目の培養条件が重要であり、2段階目において与えられる炭素源はポリエステル合成の原料であり、この炭素源の化学構造がポリエステルの構造を決定するといつてよい。従って、本発明において炭素源とは、2段階目で与えられる炭素源を意味しており、炭素源を種々調整することにより、シュードモナス属の微生物の特徴を利用して、前記のフッ素原子を含むポリエステルを発酵合成することができる。また、2段階目の培養条件としては通常pH6~8、温度25~35℃、通気量0.5~2vvm、培養時間48~96hrである。

【0019】発酵合成されたポリエステルの菌体からの回収は、常法により行うことができる。例えば、培養終了後、菌体を蒸留水およびメタノール等により洗浄し、減圧乾燥して得られる乾燥菌体をクロロホルム等を用い

ジフルオロフェノキシウンデカン酸  
 $\text{Na}_2\text{HPO}_4$   
 $\text{KH}_2\text{PO}_4$   
 $\text{NaHCO}_3$   
 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$   
 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

培養終了後、菌体を蒸留水およびメタノールで洗浄し、減圧乾燥して乾燥菌体を得た。このようにして得られた乾燥菌体を30℃で5時間抽出した。菌体除去後、クロロホルム抽出液にメタノールを10倍量加えてポリエステルの沈殿回収した。得られたポリエステルの120℃、90分間メタノリシスを行ない、モノマー体をメチルエステルとして光散乱分子重量測定装置を備えたキャピラリーガスクロマトグラフにより昇温分析をした。キャピラリーガスクロマトグラフはHP5890 (Hewlett Packard社製)、光散乱分子重量測定装置はmini DAWN (ワイアットテクノロジー社)を用いて行った。使用したカラムはJ&W社製のヒューズド・シリカ・キャピラリーカラムDB-5 (カラム内径0.25mm、液膜厚0.25μm、カラム長30m)である。初発温度90℃、5分、昇温速度5℃/分、最終温度250℃、2分の条件で行った。図1は得られたポリマーのメチルエステル化処理物のガスクロマトグラフによる分析結果である。図2にはポリエステルの $^{13}\text{C}$ -NMR (100MHz)の解析結果であるが、この結果からこのポリエステルが3H5 (DFP) Pユニットの1成分からなるホモポリマーであることが確認

て抽出処理し、遠心分離、ろ過等により菌体除去後、抽出液にメタノールを加えてポリエステルの沈殿回収することができる。

【0020】

【実施例】以下、本発明を具体的に実施例により説明するが、本発明は以下の実施例に何ら限定されるものではない。

実施例1

シュードモナス・アチダ27N01株 (特許微生物生物センター; 受託番号FERM P-16953号) を以下に示す培地を用いて30℃、24時間振盪培養した。即ち、次の培地組成からなるものに水を加えて全量を1リットルとし (pH7.0)、培地を調製した。

クエン酸	4 g
$\text{Na}_2\text{HPO}_4$	2 g
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	2 g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.2 g
イーストエキス	0.3 g

【0021】培養終了後、培養プロセスを遠心分離して菌体を回収し、さらに次に示す培地中に全量を加えて、30℃、96時間振盪培養した。即ち、次の培地組成からなるものに水を加えて全量を1リットルとし (pH7.0)、培地を調製した。

2 g
2 g
1.5 g
0.2 g
0.02 g

された。

【0022】実施例2

実施例1の1段階目の培養で炭素源としてクエン酸のかわりにオクタン酸を用いて同様の実験を行った。その結果、3HHx、3HO、3H5 (DFP) Pユニットからなる3成分系の共重合体が得られた。

【0023】実施例3

実施例1の2段階目の培養で炭素源としてジフルオロフェノキシウンデカン酸のかわりにモノフルオロフェノキシウンデカン酸を用いて同様の実験を行った。その結果、3H5 (MFP) Pユニットの1成分からなるホモポリマーであることが確認された。

【0024】実施例4

実施例3の1段階目の培養で炭素源としてクエン酸のかわりにオクタン酸を用いて同様の実験を行った。その結果、3HHx、3HO、3H5 (MFP) Pユニットからなる3成分系の共重合体が得られた。

【0025】実施例5

実施例1の1段階目の培養で炭素源としてクエン酸のかわりにノナン酸を用いて同様の実験を行った。その結果、3HHp、3HN、3H5 (DFP) Pユニットからなる

(7) 開2000-72865 (P2000-72865A)

る3成分系の共重合体が得られた。

【0026】実施例6

実施例3の1段目の培養で炭素源としてクエン酸のかわりにノナン酸を用いて同様の実験を行った。その結果、3HHp、3HN、3H5 (MFP) Pユニットからなる3成分系の共重合体が得られた。

【0027】実施例7

フェノキシ基にフッ素基が導入されていないポリマーと2個フッ素基が導入されている同じ構造をもつポリマーの融点を調べたところ約40℃の差があり、2個のフッ素基をもつポリマーは100℃以上の融点を有していた。

【0028】

【発明の効果】微生物の発酵合成するプラスチックは生

分解性プラスチックとして、よく研究されてきた。側鎖中にフッ素基を導入したものは従来より存在したが、ホモポリマーとしてではなく共重合体ユニットとして50%以下しか含有することができなかった。本発明では幅広い資化性をもつシェードモナス・ブチダを用いることとフェノキシ基の芳香環上にフッ素基を導入することによりフッ素基をもつユニットを100%含むホモポリマーを合成できた。このポリマーは従来の置換基を含むポリマーが達成できていない融点を100℃以上にすることができ、物性の改良が期待できる。さらに、このポリマー中に含まれるこれらユニットの量をコントロールすることにより、望ましい物性を得ることができる。また、親水性、生体内合成に特有の立体規則性に由来する光学分割性も期待することができる。

フロントページの続き

(51)Int. Cl.

識別記号

FI

(参考)

(C12P 7/62

C12R 1:40)

Fターム(参考) 4B064 AD83 CA02 CC03 CD07 DA16

4B065 AA44X BA22 B808 CA12

CA54

4J029 AA02 AB01 AC01 AC02 AD10

EE04 KB02

# POLYHYDROXYALKANOATE AND METHOD FOR PRODUCING THE SAME BY USING MICROORGANISM

Publication number: JP2001288256

Publication date: 2001-10-16

Inventor: YANO TETSUYA; IMAMURA TAKESHI; HONMA TSUTOMU; KENMOKU TAKASHI; SUDA SAKAE; KOBAYASHI TOYOKO;  
KOBAYASHI TATSU

Applicant: CANON KK

Classification:

- international:

C08G63/05; C08G63/662; C08G63/685; C08L101/16; C12N1/20; C12P7/62; C12R1/38; C08G63/00; C08L101/00;  
C12N1/20; C12P7/62; (IPC1-7): C08G63/08; C12N1/20; C12P7/62; C12N1/20; C12R1/38; C12N1/20; C12R1/40; C12P7/62;  
C12R1/38; C12P7/62; C12R1/40

- European:

C08G63/06; C08G63/682B; C08G63/685B; C12P7/62A

Application number: JP20000381323 20001128

Priority number(s): JP20000381323 20001128; JP19990371864 19991227; JP19990371867 19991227; JP19990371869 19991227;  
JP19990371868 19991227; JP20000023024 20000131; JP20000023025 20000131

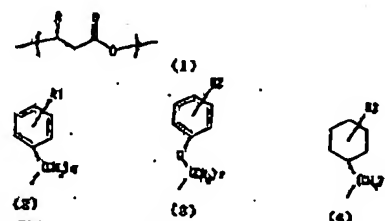
Also published as:

EP1118629 (A2)  
US6521429 (B2)  
US2001029039 (A1)  
KR20040010425 (A)  
KR20010082808 (A)

more >>

Abstract of JP2001288256

**PROBLEM TO BE SOLVED:** To provide a polyhydroxyalkanoate (PHA) comprising units of a variously structured monomer having a substituent as a side chain and being useful as a device material, a medical material, or the like and a method for producing PHA by using microorganisms. **SOLUTION:** An  $\omega$ -substituted linear alkanolic acid which is substituted with one six-membered atomic group selected from a substituted or unsubstituted phenyl group, a substituted or unsubstituted phenoxy group, and a substituted cyclohexyl group at a molecular terminal is used as a starting material used in a culture medium, and microorganisms are cultured in the medium to produce a polyhydroxyalkanoate comprising units derived from a monomer being the corresponding  $\omega$ -substituted-3-hydroxy-alkanoic acid.



Data supplied from the esp@conet database - Worldwide

Report a data error here

(19)日本特許庁(JP)

(12)公開特許公報(A)

(11)特許出願公開番号

特開2001-288256

(P2001-288256A)

(43)公開日 平成13年10月16日(2001.10.16)

(51)Int.Cl.	識別記号	FI	サーチコード(参考)
C08G 63/06	ZBP	C08G 63/06	ZBP 4B064
C12N 1/20	ZNA	C12N 1/20	ZNAD 4B065
C12P 7/62		C12P 7/62	4J029
// (C12N 1/20		(C12N 1/20	D
C12R 1:38)		C12R 1:38)	

審査請求 未請求 請求項の数26 OL (全 81 頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2000-361323(P2000-361323)

(22)出願日 平成12年11月28日(2000.11.28)

(31)優先権主張番号 特願平11-371864

(32)優先日 平成11年12月27日(1999.12.27)

(33)優先権主張国 日本(JP)

(31)優先権主張番号 特願平11-371867

(32)優先日 平成11年12月27日(1999.12.27)

(33)優先権主張国 日本(JP)

(31)優先権主張番号 特願平11-371868

(32)優先日 平成11年12月27日(1999.12.27)

(33)優先権主張国 日本(JP)

(71)出願人 000001007

キヤノン株式会社

東京都大田区下丸子3丁目30番2号

(72)発明者 矢野 哲哉

東京都大田区下丸子3丁目30番2号 キヤノン株式会社内

(72)発明者 今村 剛士

東京都大田区下丸子3丁目30番2号 キヤノン株式会社内

(74)代理人 100088328

弁理士 金田 曜之 (外2名)

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 ポリヒドロキシアルカノエートおよび微生物を利用するその製造方法

(57)【要約】

【課題】 デバイス材料や医療用材料等として有用な置換基を側鎖に有する多様な構造のモノマーユニットを含むPHAの提供、ならびに、当該PHAを微生物を利用して製造する方法の提供。

【解決手段】 微生物を用いて、鎖の末端に、置換または未置換フェニル基、置換または未置換フェノキシ基、置換または未置換シクロヘキシル基の何れかの6員環原子団が置換されている、 $\omega$ -置換-直鎖アルカン酸を原料として、対応する $\omega$ -置換-3-ヒドロキシ-アルカン酸をモノマーユニットとして含むポリヒドロキシアルカノエートを製造する。

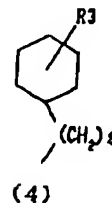
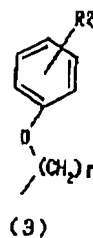
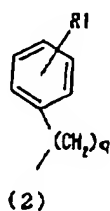
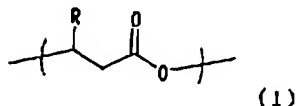


(2) 001-288256 (P2001-288256A)

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 下記一般式(1)で示されるモノマースユニットからなるポリヒドロキシアルカノエート。

【化1】



(式(2)中、R1は、水素原子(H)、ハロゲン原子、-CN、-NO<sub>2</sub>、-CF<sub>3</sub>、-C<sub>2</sub>F<sub>5</sub>、-C<sub>3</sub>F<sub>7</sub>から選択される基であり、qは、1~8の整数から選択される；式

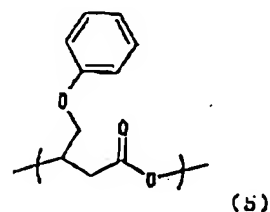
(3)中、R2は、水素原子(H)、ハロゲン原子、-CN、-NO<sub>2</sub>、-CF<sub>3</sub>、-C<sub>2</sub>F<sub>5</sub>、-C<sub>3</sub>F<sub>7</sub>から選択される基であり、rは、1~8の整数から選択される；式(4)

中、R3は、水素原子(H)、ハロゲン原子、-CN、-NO<sub>2</sub>、-CF<sub>3</sub>、-C<sub>2</sub>F<sub>5</sub>、-C<sub>3</sub>F<sub>7</sub>から選択される基であり、sは、1~8の整数から選択される；但し、上記一般式

(1)におけるRとして、一種の基を選択する際には、式(2)において、R1=Hでq=2の基、R1=Hでq=3の基、式(3)において、R2=ハロゲン原子でr=2の基、R2=-CNでr=3の基、R2=-NO<sub>2</sub>でr=3の基、は、選択肢からは除外され、二種の基を選択する際には、式(2)において、R1=Hでq=3及び5の二種の基の組み合わせ、式(3)において、R2=Hでr=1及び3の二種の基の組み合わせ、R2=Hでr=2及び4の二種の基の組み合わせ、R2=Hでr=2及び6の二種の基の組み合わせ、R2=ハロゲン原子でr=2及び4の二種の基の組み合わせ、は、選択肢からは除外され、三種の基を選択する際には、式(2)において、R1=Hでq=3、5及び7の三種の基の組み合わせ、式(3)において、R2=Hでr=1、3及び5の三種の基の組み合わせ、R2=Hでr=2、4及び6の三種の基の組み合わせ、は、選択肢からは除外される)

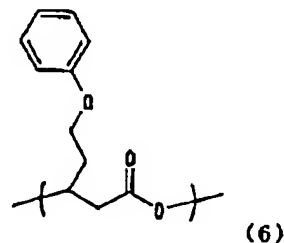
【請求項2】 下記式(5)で示される3-ヒドロキシ-4-フェノキシ酪酸ユニットからなる請求項1に記載のポリヒドロキシアルカノエート

【化3】



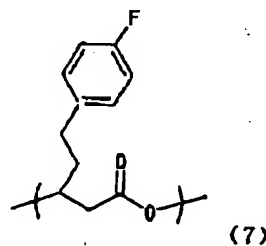
【請求項3】 下記式(6)で示される3-ヒドロキシ-5-フェノキシ古草酸ユニットからなる請求項1に記載のポリヒドロキシアルカノエート。

【化4】



【請求項4】 下記式(7)で示される3-ヒドロキシ-5-(4-フルオロフェニル)古草酸ユニットからなる請求項1に記載のポリヒドロキシアルカノエート。

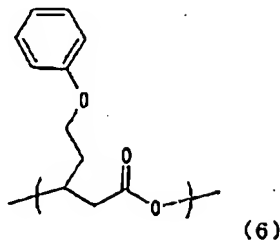
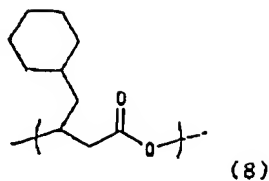
【化5】



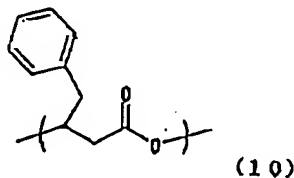
【請求項5】 下記式(8)で示される3-ヒドロキシ-4-シクロヘキシル酪酸ユニットからなる請求項1に記載のポリヒドロキシアルカノエート。

(3) 001-288256 (P2001-288256A)

【化6】

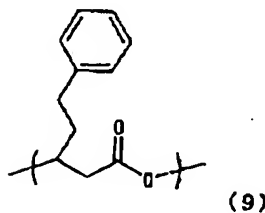


【請求項7】 下記式(10)で示される3-ヒドロキシ-4-フェニル酪酸ユニットと下記式(11)で示される3-ヒドロキシ-6-フェニルヘキサン酸ユニット



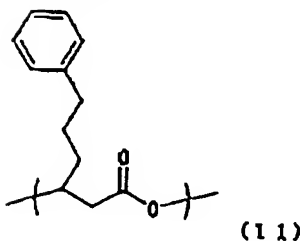
【請求項6】 下記式(6)で示される3-ヒドロキシ-5-フェノキシ苧草酸ユニットと下記式(9)で示される3-ヒドロキシ-5-フェニル苧草酸ユニットとからなる請求項1に記載のポリヒドロキシアルカノエート。

【化7】



とからなる請求項1に記載のポリヒドロキシアルカノエート。

【化8】

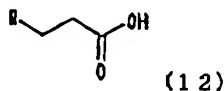


【請求項8】 数平均分子量が、1万~20万である請求項1~7のいずれか1項に記載のポリヒドロキシアルカノエート。

【請求項9】 ポリヒドロキシアルカノエートの製造方法であって、原料とするアルカノエートと酵母エキスを含む培地で、前記アルカノエートを利用して前記ポリヒドロキシアルカノエートを生産する微生物を培養する工程を有することを特徴とするポリヒドロキシアルカノエートの製造方法。

【請求項10】 原料とする前記アルカノエートが下記一般式(12)で表されるアルカノエートであり、目的産物である前記ポリヒドロキシアルカノエートが下記式(13)で表されるモノマーユニットを有するポリヒドロキシアルカノエートであることを特徴とする請求項9に記載のポリヒドロキシアルカノエートの製造方法。

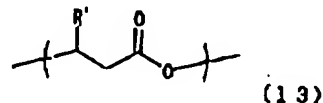
【化9】



(式(12)中、Rは、下記一般式(2)、一般式(3)、あるいは一般式(4)のいずれかで示される基

から選択される少なくとも1つ以上の基である)

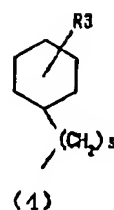
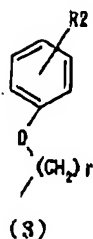
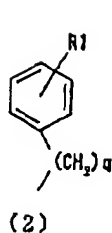
【化10】



(式(13)中、R'は、上記式(12)においてRとして選択された基、ならびに、このRとして選択された基が、下記式(2)で示され、 $q=q_0$ の基である場合、対応するR1を有し、 $q=q_0-2$ 、 $q=q_0-4$ 、あるいは $q=q_0-6$ の基、下記式(3)で示され、 $r=r_0$ の基である場合、対応するR2を有し、 $r=r_0-2$ 、 $q=r_0-4$ 、あるいは $r=r_0-6$ の基、下記式(4)で示され、 $s=s_0$ の基である場合、対応するR3を有し、 $s=s_0-2$ 、 $s=s_0-4$ 、あるいは $s=s_0-6$ の基、から選択される少なくとも1つ以上の基である。なお、 $q_0-2$ 、 $r_0-2$ あるいは $s_0-2$ 、 $q_0-4$ 、 $r_0-4$ あるいは $s_0-4$ 、 $q_0-6$ 、 $r_0-6$ あるいは $s_0-6$ は、1以上の整数値のみを取り得る)

【化11】

(4) 001-288256 (P2001-288256A)

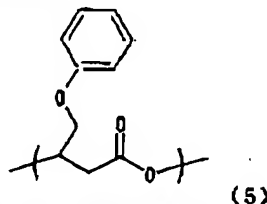


(式(2)中、R1は、水素原子(H)、ハロゲン原子、 $-\text{CN}$ 、 $-\text{NO}_2$ 、 $-\text{CF}_3$ 、 $-\text{C}_2\text{F}_5$ 、 $-\text{C}_6\text{F}_7$ から選択される基であり、qは、1~8の整数から選択される；式(3)中、R2は、水素原子(H)、ハロゲン原子、 $-\text{CN}$ 、 $-\text{NO}_2$ 、 $-\text{CF}_3$ 、 $-\text{C}_2\text{F}_5$ 、 $-\text{C}_6\text{F}_7$ から選択される基であり、rは、1~8の整数から選択される；式(4)中、R3は、水素原子(H)、ハロゲン原子、 $-\text{CN}$ 、 $-\text{NO}_2$ 、 $-\text{CF}_3$ 、 $-\text{C}_2\text{F}_5$ 、 $-\text{C}_6\text{F}_7$ から選択される基であり、sは、1~8の整数から選択される)

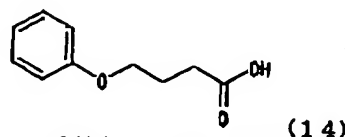
【請求項11】 下記式(5)で表されるモノマーユニットからなるポリヒドロキシアルカノエートの製造方法であって、

下記式(14)で表される4-フェノキシ酪酸と酵母エキスをを含む培地で、4-フェノキシ酪酸を利用してポリ-3-ヒドロキシ-4-フェノキシ酪酸を生産する微生物を培養する工程を有することを特徴とする請求項10に記載のポリヒドロキシアルカノエートの製造方法。

【化12】

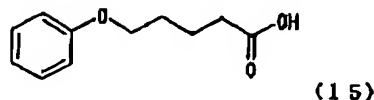
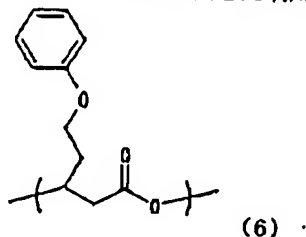


【請求項12】 下記式(6)で表されるモノマーユニットからなるポリヒドロキシアルカノエートの製造方法であって、  
下記式(15)で表される5-フェノキシ吉草酸と酵母エキスをを含む培地で、5-フェノキシ吉草酸を利用し



てポリ-3-ヒドロキシ-5-フェノキシ吉草酸を生産する微生物を培養する工程を有することを特徴とする請求項10に記載のポリヒドロキシアルカノエートの製造方法。

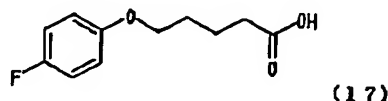
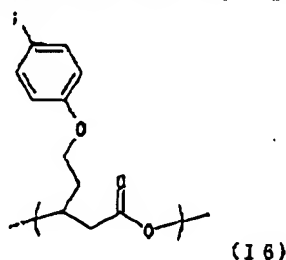
【化13】



【請求項13】 下記式(16)で表されるモノマーユニットからなるポリヒドロキシアルカノエートの製造方法であって、  
下記式(17)で表される5-(4-フルオロフェノキシ)吉草酸と酵母エキスをを含む培地で、5-(4-フルオロフェノキシ)吉草酸を利用してポリ-3-ヒドロ

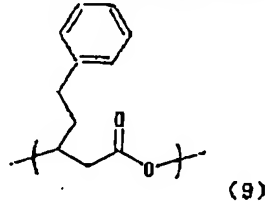
キシ-5-(4-フルオロフェノキシ)吉草酸を生産する微生物を培養する工程を有することを特徴とする請求項10に記載のポリヒドロキシアルカノエートの製造方法。

【化14】

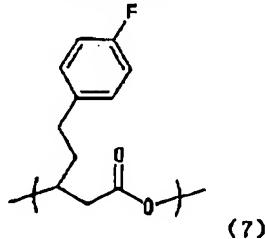


(5) 001-288256 (P2001-288256A)

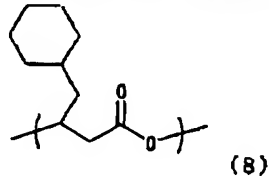
【請求項14】 下記式(9)で表されるモノマーユニットからなるポリヒドロキシアルカノエートの製造方法であって、  
下記式(18)で表される5-フェニル吉草酸と酵母エキスをを含む培地で、5-フェニル吉草酸を利用してホ



【請求項15】 下記式(7)で表されるモノマーユニットからなるポリヒドロキシアルカノエートの製造方法であって、  
下記式(19)で表される5-(4-フルオロフェニル)吉草酸と酵母エキスをを含む培地で、5-(4-フ

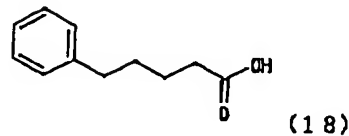


【請求項16】 下記式(8)で表されるモノマーユニットからなるポリヒドロキシアルカノエートの製造方法であって、  
下記式(20)で表される4-シクロヘキシル酪酸と酵母エキスをを含む培地で、4-シクロヘキシル酪酸を利

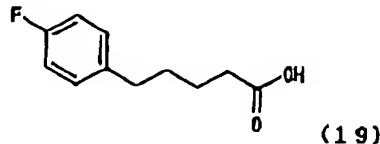


【請求項17】 下記式(6)で表されるモノマーユニットと下記式(9)で表されるモノマーユニットとからなるポリヒドロキシアルカノエートの製造方法であって、  
下記式(15)で表される5-フェノキシ吉草酸及び下記式(18)で表される5-フェニル吉草酸と酵母エキスをを含む培地で、5-フェノキシ吉草酸及び5-フェ

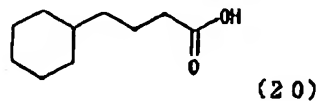
リ-3-ヒドロキシ-5-フェニル吉草酸を生産する微生物を培養する工程を有することを特徴とする請求項10に記載のポリヒドロキシアルカノエートの製造方法。  
【化15】



ルオロフェニル)吉草酸を利用してポリ-3-ヒドロキシ-5-(4-フルオロフェニル)吉草酸を生産する微生物を培養する工程を有することを特徴とする請求項10に記載のポリヒドロキシアルカノエートの製造方法。  
【化16】

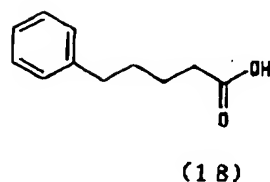
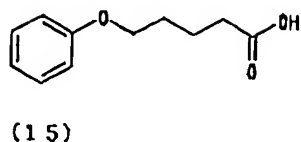
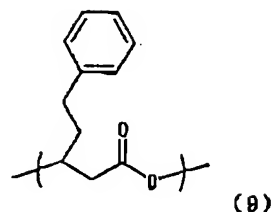
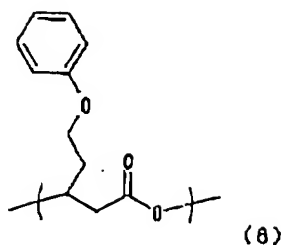


用してポリ-3-ヒドロキシ-4-シクロヘキシル酪酸を生産する微生物を培養する工程を有することを特徴とする請求項10に記載のポリヒドロキシアルカノエートの製造方法。  
【化17】



ニル吉草酸を利用して、それぞれ3-ヒドロキシ-5-フェノキシ吉草酸及び3-ヒドロキシ-5-フェニル吉草酸からなるポリヒドロキシアルカノエートを生産する微生物を培養する工程を有することを特徴とする請求項10に記載のポリヒドロキシアルカノエートの製造方法。  
【化18】

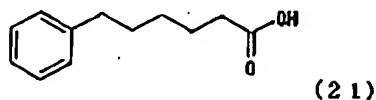
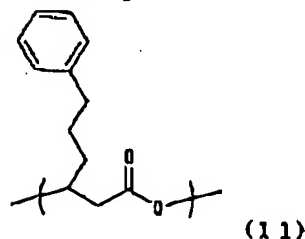
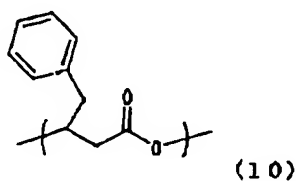
(6) 001-288256 (P2001-288256A)



【請求項18】 下記式(10)で表されるモノマーユニット及び下記式(11)で表されるモノマーユニットからなるポリヒドロキシアルカノエートの製造方法であって、  
下記式(21)で表される6-フェニルヘキサン酸と酵母エキスを含有する培地で、6-フェニルヘキサン酸を利

用して3-ヒドロキシ-4-フェニル酪酸及び3-ヒドロキシ-6-フェニルヘキサン酸からなるポリヒドロキシアルカノエートを生産する微生物を培養する工程を有することを特徴とする請求項10に記載のポリヒドロキシアルカノエートの製造方法。

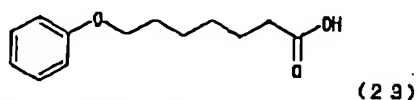
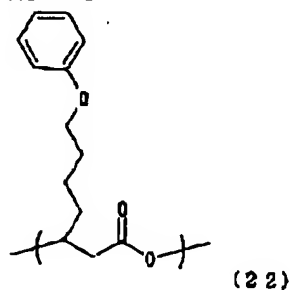
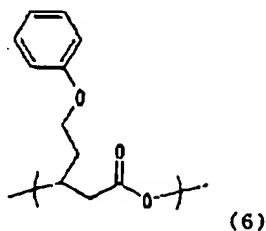
【化19】



【請求項19】 下記式(6)で表されるモノマーユニット及び下記式(22)で表されるモノマーユニットからなるポリヒドロキシアルカノエートの製造方法であって、  
下記式(23)で表される7-フェノキシヘプタン酸と酵母エキスを含有する培地で、7-フェノキシヘプタン酸

を利用して3-ヒドロキシ-5-フェノキシ吉草酸及び3-ヒドロキシ-7-フェノキシヘプタン酸からなるポリヒドロキシアルカノエートを生産する微生物を培養する工程を有することを特徴とする請求項10に記載のポリヒドロキシアルカノエートの製造方法。

【化20】



【請求項20】 下記式(5)で表されるモノマーユニット、

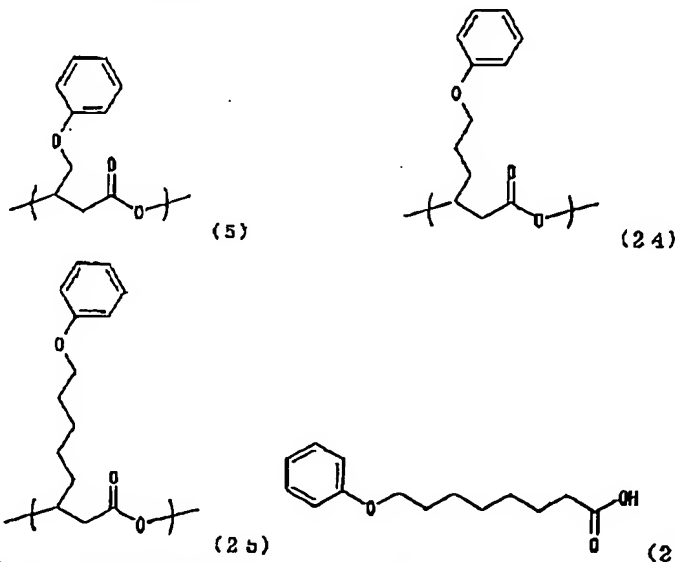
下記式(24)で表されるモノマーユニット及び

(7) 001-288256 (P2001-288256A)

下記式(25)で表されるモノマーユニットからなるポリヒドロキシアルカノエートの製造方法であって、  
 下記式(26)で表される8-フェノキシオクタン酸と酵母エキスを含む培地で、8-フェノキシオクタン酸を利用して3-ヒドロキシ-4-フェノキシ酪酸、3-ヒドロキシ-6-フェノキシヘキサン酸及び3-ヒドロ

キシ-8-フェノキシオクタン酸からなるポリヒドロキシアルカノエートを生産する微生物を培養する工程を有することを特徴とする請求項10に記載のポリヒドロキシアルカノエートの製造方法。

【化21】

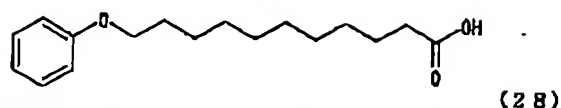
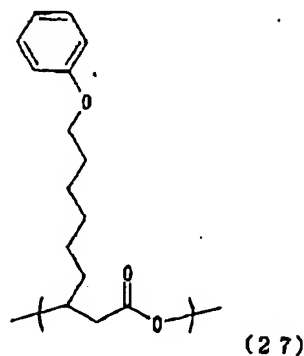
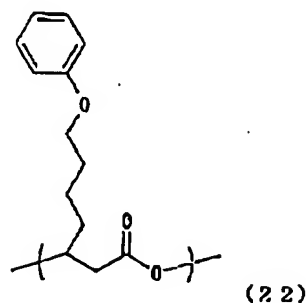
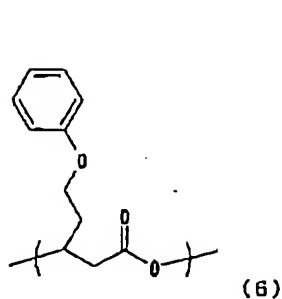


【請求項21】 下記式(6)で表されるモノマーユニット、下記式(22)で表されるモノマーユニット及び下記式(27)で表されるモノマーユニットからなるポリヒドロキシアルカノエートの製造方法であって、  
 下記式(28)で表される11-フェノキシウンデカン酸と酵母エキスを含む培地で、11-フェノキシウンデカン酸を利用して3-ヒドロキシ-5-フェノキシ吉

草酸、3-ヒドロキシ-7-フェノキシヘプタン酸及び3-ヒドロキシ-9-フェノキシノナン酸からなるポリヒドロキシアルカノエートを生産する微生物を培養する工程を有することを特徴とする請求項10に記載のポリヒドロキシアルカノエートの製造方法。

【化22】

(8) 001-288256 (P2001-288256A)



【請求項22】 微生物の培養が、アルカノエートと酵母エキスを含む培地による一段階で行われる請求項9に記載のポリヒドロキシアルカノエートの製造方法。

【請求項23】 微生物の培養が、アルカノエートと酵母エキスを含む培地による培養と、これに続く、アルカノエートを含む窒素源を制限した培地による培養の二段階で行われる請求項9に記載のポリヒドロキシアルカノエートの製造方法。

【請求項24】 ポリヒドロキシアルカノエートの分離／精製工程を有する請求項9に記載のポリヒドロキシアルカノエートの製造方法。

【請求項25】 微生物が、シュドモナス属 (*Pseudomonas* sp.) に属する微生物である請求項9に記載のポリヒドロキシアルカノエートの製造方法。

【請求項26】 シュドモナス属 (*Pseudomonas* sp.) に属する微生物が、シュドモナス・チコリアイ・YN2株 (*Pseudomonas cichorii* YN2, FERM P-17411)、シュドモナス・チコリアイ・H45株 (*Pseudomonas cichorii* H45, FERM P-17410)、シュドモナス・プティダ・P91株 (*Pseudomonas putida* P91, FERM P-17409)、シュドモナス・ジェッセニイ・P161株 (*Pseudomonas jessenii* P161, FERM P-17445) からなる群から選択される少なくとも1株であることを特徴とする請求

項25記載のポリヒドロキシアルカノエートの製造方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、新規なポリヒドロキシアルカノエート (PHA) ならびに、微生物を利用してかかる新規なPHAを製造する方法に関する。

【0002】

【従来の技術】長年にわたって、石油由来の合成高分子をプラスチック等として利用してきたが、使用後廃棄されるこれらプラスチック等の処理が大きな社会問題となっている。石油由来の合成高分子は、分解されにくい利点から金属材料、ガラス等の代替えを果たしてきたが、大量に消費され、また大量に廃棄される昨今では、その分解されにくいという性質が逆に災いし廃棄物処理場に蓄積されることとなった。また、焼却処理を行うとCO<sub>2</sub>排出量の増加となり、ある場合には、ダイオキシンや環境ホルモン等の有害物質の発生原因ともなる。

【0003】一方、ポリ-3-ヒドロキシ酪酸 (PHB) に代表される微生物産生ポリエステル (PHA) は、従来のプラスチックと同様、溶融加工等により各種製品の生産に利用することができるとともに、石油由来の合成高分子とは異なり、生物により分解されうるといふ特性を有している。従って、廃棄した際、微生物産生ポリエステルは生分解されることにより、自然界の物質循環に取り込まれるので、従来利用されていた、多くの

(9) 001-288256 (P2001-288256A)

合成高分子化合物のように自然環境に残留して汚染を引き起こすことがない。また、生分解処理を行うことで、燃焼処理を行う必要もないため、大気汚染や地球温暖化を防止するという観点でも有効な材料であり、環境保全を可能とするプラスチックとして利用することができる。加えて、微生物産生ポリエステルに対しては、医療用軟質部材への応用なども検討されている（特開平5-159号公報、特開平6-169980号公報、特開平6-169988号公報、特開平6-225921号公報など）。

【0004】これまで、多くの微生物がPHBあるいはその他のPHAを生産し、菌体内に蓄積することが報告されている（「生分解性プラスチックハンドブック」、生分解性プラスチック研究会編、（株）エヌ・ティー・エス発行、P178-197、1995）。このような微生物産生PHAは、その生産に用いる微生物の種類や培地組成、培養条件等により、様々な組成や構造のものとなり得ることが知られており、これまで主に、PHAの物性の改良という観点から、産生されるPHAの組成や構造の制御に関する研究がなされてきた。

【0005】例えば、アルカリゲネス・ユウトロファス H16株（*Alcaligenes eutrophus* H16, ATCC No. 17699）及びその変異株は、その培養時の炭素源を変化させることにより、3-ヒドロキシ酪酸（3HB）と3-ヒドロキシ古草酸（3HV）との共重合体を様々な組成比で生産することが報告されている（特表平6-15604号公報、特表平7-14352号公報、特表平8-19227号公報等）。

【0006】また、特許公報第2642937号では、シュドモナス・オレオボランス・ATCC29347株（*Pseudomonas oleovorans* ATCC29347）に、炭素源として非環状脂肪族炭化水素を与えることにより、炭素数が6から12までの3-ヒドロキシアルカノエートのモノマーユニットを有するPHAが生産されることが開示されている。

【0007】特開平5-74492号公報では、メチロバクテリウム属（*Methylobacterium* sp.）、パラコッカス属（*Paracoccus* sp.）、アルカリゲネス属（*Alcaligenes* sp.）、シュドモナス属（*Pseudomonas* sp.）の微生物を、炭素数3から7の第一アルコールに接触させることにより、3HBと3HVとの共重合体を生産させる方法が開示されている。

【0008】特開平5-93049号公報、及び、特開平7-265065号公報では、アエロモナス・キャビエ（*Aeromonas caviae*）を、オレイン酸やオリブ油を炭素源として培養することにより、3HBと3-ヒドロキシヘキサノ酸（3HHx）の2成分共重合体が生産されることが開示されている。

【0009】特開平9-191893号公報では、コマモナス・アシドボランス・IFO13852株（*Comamonas acidovorans* IFO13852）が、グルコン酸及び1,4-ブタンジオールを炭素源として用いた培養により、3HBと4-ヒドロキシ酪酸とをモノマーユニットとして持つポリエステルを生産することが開示されている。

【0010】さらに、ある種の微生物では、様々な置換基、例えば、不飽和炭化水素から得られる基、エステル基、アリル基、シアノ基、ニトロ基、ハロゲン化炭化水素から得られる基、エポキシド等が導入されたPHAを生産することが報告されており、このような手法によって微生物産生PHAの物性改良を目指す試みもなされ始めている。これら置換基が導入された微生物産生ポリエステルの事例は、FEMS Microbiology Letters, 128 (1995) p219-228に詳細に記載されているが、例えば、Makromol. Chem., 191, 1957-1965, 1990, Macromolecules, 24, 5256-5260, 1991, Chirality, 3, 492-494, 1991等では、シュドモナス・オレオボランスが3-ヒドロキシ-5-フェニル古草酸（3HPV）モノマーユニットを含むPHAを生産することが報告されており、3HPVモノマーユニットが含まれることに起因すると考えられる、ポリマー物性の変化が認められている。

【0011】

【発明が解決しようとする課題】以上のように、微生物産生PHAにおいては、その製造に用いる微生物の種類や培地組成、培養条件等を変えることにより、各種の組成・構造のものが得られているが、プラスチックとしての応用を考えた場合、物性的に未だ十分であるとは言えない。微生物産生PHAの利用範囲をさらに拡大していくためには、物性の改良をより幅広く検討していくことが重要であり、そのためにはさらに多様な構造のモノマーユニットを含むPHAと、その製造方法、ならびに所望のPHAを効率的に生産しうる微生物の開発、探索が必須である。

【0012】一方、前述のような、置換基を側鎖に導入したタイプのPHAは、導入した置換基を所望とする特性等に応じて選択することで、導入した置換基の特性等に起因する、極めて有用な機能や特性を具備した「機能性ポリマー」としての展開も期待できる。すなわち、そのような機能性と生分解性とを両立可能であるような優れたPHAと、その製造方法、ならびに、所望のPHAを効率的に生産しうる微生物の開発、探索もまた重要な課題である。

【0013】このような置換基を側鎖に導入したPHAの例としては、フェノキシ基を側鎖に有するPHAが挙げられる。



(01)01-288256 (P2001-288256A)

【0014】例えば、Macromol. Chem. Phys. 195, 1665-1672 (1994) には、シュードモナス・オレオボランス (*Pseudomonas oleovorans*) が11-フェノキシウンデカン酸から3-ヒドロキシ-5-フェノキシ吉草酸及び3-ヒドロキシ-9-フェノキシノナン酸をユニットとして含むPHAを生産することが報告されている。

【0015】また、Macromolecules, 29, 3432-3435 (1996) には、シュードモナス・オレオボランス (*Pseudomonas oleovorans*) を用いて、6-フェノキシヘキサン酸から3-ヒドロキシ-4-フェノキシ酪酸及び3-ヒ

ドロキシ-6-フェノキシヘキサン酸をユニットとして含むPHAを、8-フェノキシオクタン酸から3-ヒドロキシ-4-フェノキシ酪酸及び3-ヒドロキシ-6-フェノキシヘキサン酸及び3-ヒドロキシ-8-フェノキシオクタン酸をユニットとして含むPHAを、11-フェノキシウンデカン酸から3-ヒドロキシ-5-フェノキシ吉草酸及び3-ヒドロキシ-7-フェノキシヘプタン酸をユニットとして含むPHAを生産することが報告されている。この報告におけるポリマーの収率を抜粋すると以下のとおりである。

【0016】

【表1】

炭素数 (アルカノエート)	乾燥菌体重量 (mg/l)	乾燥ポリマー重量 (mg/l)	収率 (%)
6-フェノキシヘキサン酸	950	100	10.5
8-フェノキシオクタン酸	820	90	11
11-フェノキシウンデカン酸	150	15	10

【0017】更に、Can. J. Microbiol., 41, 32-43 (1995) では、シュードモナス・オレオボランス (*Pseudomonas oleovorans*) ATCC 29347株及びシュードモナス・プチダ (*Pseudomonas putida*) KT 2442株を用いて、オクタン酸とp-シアノフェノキシヘキサン酸或いはp-ニトロフェノキシヘキサン酸を基質として、3-ヒドロキシ-p-シアノフェノキシヘキサン酸或いは3-ヒドロキシ-p-ニトロフェノキシヘキサン酸をモノマーユニットとして含むPHAの生産に成功している。

【0018】特許第2989175号公報には、3-ヒドロキシ-5- (モノフルオロフェノキシ) ペンタノエート (3H5 (MFP) P) ユニットあるいは3-ヒドロキシ-5- (ジフルオロフェノキシ) ペンタノエート (3H5 (DFP) P) ユニットからなるホモポリマー、少なくとも3H5 (MFP) Pユニットあるいは3H5 (DFP) Pユニットを含有するコポリマー；これらのポリマーを合成するシュードモナス・プチダ；シュードモナス属を用いた前記のポリマーの製造方法が記載されている。

【0019】これらの生産は以下の様な「二段階培養」で行われている。

培養時間：一段目、24時間；二段目、96時間

各段における基質と得られるポリマーを以下に示す。

(1) 得られるポリマー：3H5 (MFP) Pホモポリマー

一段目の基質：クエン酸、イーストエキス

二段目の基質：モノフルオロフェノキシウンデカン酸

(2) 得られるポリマー：3H5 (DFP) Pホモポリマー

一段目の基質：クエン酸、イーストエキス

二段目の基質：ジフルオロフェノキシウンデカン酸  
(3) 得られるポリマー：3H5 (MFP) Pコポリマー

一段目の基質：オクタン酸あるいはノナン酸、イーストエキス

二段目の基質：モノフルオロフェノキシウンデカン酸  
(4) 得られるポリマー：3H5 (DFP) Pコポリマー

一段目の基質：オクタン酸あるいはノナン酸、イーストエキス

二段目の基質：ジフルオロフェノキシウンデカン酸  
その効果としては、置換基をもつ中鎖脂肪酸を資化して、側鎖末端が1から2個のフッ素原子が置換したフェノキシ基をもつポリマーを合成することができ、融点が高く良い加工性を保ちながら、立体規則性、親水性を与えることができるとしている。

【0020】また、シクロヘキシル基をモノマーユニット中に含むPHAは、通常の脂肪酸ヒドロキシアルカン酸をユニットとして含むPHAとは異なる高分子物性を示すことが期待されており、シュードモナス・オレオボランス (*Pseudomonas oleovorans*) による生産の例が報告されている (Macromolecules, 30, 1611-1615 (1997))。

【0021】この報告によれば、シュードモナス・オレオボランスを、ノナン酸 (以下、NAと記載する) と4-シクロヘキシル酪酸 (以下、CHBAと記載する) あるいは5-シクロヘキシル吉草酸 (以下、CHVAと記載する) の共存する培地中で培養すると、シクロヘキシル基を含むユニットと、ノナン酸由来のユニットを含むPHAが得られている (各割合は不明)。

【0022】その収率等に関しては、CHBAに対し

(1) 01-288256 (P2001-288256A)

て、基質濃度トータル20 mMの条件で、CHBAとNAの量比を変化させ、表2に示すような結果を得たと報告されている。

【0023】

【表2】

NA:CHBA	CDW	PDW	収率	ユニット
5:5	756.0	89.1	11.8	NA, CHBA
1:9	132.8	19.3	14.5	NA, CHBA

【0024】CDW:乾燥菌体重量 (mg/L)、

PDW:乾燥ポリマー重量 (mg/L)、

収率: PDW/CDW (%)

しかしながら、この例では、培養液当たりのポリマー収率は十分なものではなく、また、得られたPHA自体も、そのモノマーユニット中にはノナン酸由来の脂肪酸ヒドロキシアルカン酸が混在しているものである。

【0025】このように、様々な置換基を側鎖に導入したPHAを微生物により製造しようとする場合、先に挙げたシェードモナス・オレオボランスの報告例等に見られるように、導入しようとする置換基を有するアルカノエートを、ポリマー原料としての利用に加えて増殖用炭素源としても利用する方法が用いられている。

【0026】しかしながら、導入しようとする置換基を有するアルカノエートを、ポリマー原料としての利用に加えて増殖用炭素源としても利用する方法は、当該アルカノエートからのβ酸化によるアセチル-COAの生成に基づく炭素源及びエネルギー源の供給を期待されており、このような方法においては、ある程度の鎖長を有する基質でないとβ酸化によりアセチル-COAを生成することができず、このためPHAの基質として用いるアルカノエートが限定されてしまう点が大きな課題である。また、一般的に、β酸化により鎖長がメチレン鎖2つ分ずつ短くなった基質が新たに生成し、これらがPHAのモノマーユニットとして取り込まれるため、合成されるPHAは鎖長がメチレン鎖2つ分ずつ異なるモノマーユニットからなる共重合体となることが多い。前述の報告例では、基質である8-フェノキシオクタン酸由来の3-ヒドロキシ-8-フェノキシオクタン酸と、代謝産物由来の副生物である3-ヒドロキシ-6-フェノキシヘキサン酸及び3-ヒドロキシ-4-フェノキシ酪酸の3種類のモノマーユニットからなる共重合体が生産される。この点で、単一のモノマーユニットからなるPHAを得ようとする場合、この方法を用いることは極めて難しい。さらに、β酸化によるアセチル-COAの生成に基づいた炭素源及びエネルギー源の供給を前提とした方法では、微生物の増殖が遅く、PHAの合成に時間がかかる点、合成されたPHAの収率が低くなりがちな点も大きな課題である。

【0027】このため、導入しようとする置換基を有するアルカノエートに加えて、増殖用炭素源として、オクタン酸やノナン酸といった中鎖の脂肪酸等を共存させた培地で微生物を培養したのち、PHAを抽出する方法が

有効と考えられ、一般的に用いられている。

【0028】しかしながら、前記の方法で生産されたPHAには、導入しようとする置換基を有するモノマーユニットと、増殖用炭素源に由来するモノマーユニット（例えば、3-ヒドロキシオクタン酸や3-ヒドロキシノナン酸等）とが混在する。これらの中鎖長 (mcl: medium chain length) モノマーユニットは、単独の組成においては常温で粘性のポリマーであり、本発明の目的とするPHAに混在した場合、ポリマーのガラス転移温度 (Tg) を著しく低下させる。このため、常温で硬いポリマー物性を得ようとする場合、mclモノマーユニットの混在は望ましくない。また、このようなヘテロな側鎖構造は分子内あるいは分子間での側鎖構造に由来する相互作用を妨害し、結晶性あるいは配向性に大きな影響を与えることが知られている。ポリマー物性の向上、機能性の付与を達成するにあたり、これらのmclモノマーユニットの混在は大きな課題である。この課題の解決手段としては、特定の置換基を有するモノマーユニットのみで構成されたPHAを取得するために、増殖用炭素源由来のmclモノマーユニット等の「目的外」のモノマーユニットを分離/除去するための精製工程を設けることが挙げられる。しかしながら、操作が煩雑となる上、収率の大幅な低下も避けられない点が課題となる。さらに大きな問題点は、目的のモノマーユニットと目的外のモノマーユニットとが共重合体を形成している場合、目的外のモノマーユニットのみを除去するのは極めて困難な点である。特に、不飽和炭化水素から得られる基、エステル基、アリール基、シアノ基、ニトロ基、ハロゲン化炭化水素から得られる基、エポキシ基等が導入された基を側鎖構造として有するようなモノマーユニットを含むPHAの合成を目的とする場合、mclモノマーユニットは目的のモノマーユニットと共重合体を形成する場合が多く、PHA合成後のmclモノマーユニット除去は極めて困難である。

【0029】本発明は前記の課題を解決するものであり、本発明の目的は、デバイス材料や医療用材料等として有用な置換基を側鎖に有する多様な構造のモノマーユニットを含むPHAの提供、ならびに、当該PHAを微生物を利用して製造する方法の提供、特に、目的外のモノマーユニットの混在が少なく、しかも高収率な製造方法を提供することにある。さらには、目的外のモノマーユニットの混在がなく、所望のモノマーユニットのみで構成される新規なPHAの提供、ならびに、当該PH

(12) 01-288256 (P2001-288256A)

Aを微生物を利用して製造する方法を提供することにある。

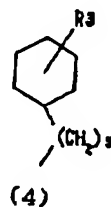
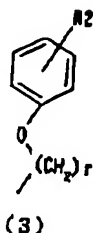
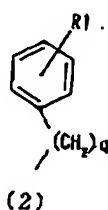
【0030】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、前記の課題を解決すべく、特に、デバイス材料や医療用材料等として有用な、置換あるいは無置換のフェノキシ基、フェニル基及びシクロヘキシル基を側鎖上に有するPHAの開発を目指して、PHAを生産し、菌体内に蓄積する能力を有する新規な微生物の探索、ならびに、新規な微生物を用いて、所望のPHAを製造する方法について、鋭意研究を進めた。

【0031】さらに、目的外のモノマーユニットの混在をなくし、効率的に所望とするPHAを得られる方法を開発すべく、鋭意研究・検討を重ねてきた結果、微生物を培養する際、対応する原子団を有する原料のアルカノエートに加え、酵母エキスを添加した培地で微生物の培養を行うことによって、目的外のモノマーユニットを混在させることなく所望とするPHAのみを選択的に生産できること、あるいは目的外のモノマーユニットの混在を少なくできることを見出し、本発明を完成するに至った。

【0032】すなわち、本発明のポリヒドロキシアルカノエートの製造方法は、目的とするポリヒドロキシアルカノエートを製造する際、原料とするアルカノエートと酵母エキスをを含む培地で、前記アルカノエートを利用して前記ポリヒドロキシアルカノエートを生産する微生物を培養する工程を有することを特徴とするポリヒドロキシアルカノエートの製造方法である。かかる本発明のポリヒドロキシアルカノエートの製造方法は、より具体的に記載すると下記する形態で実施されるものである。

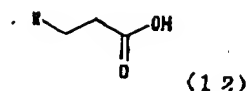
【0033】すなわち、本発明のポリヒドロキシアルカノエートの製造方法における第一の形態は、下記式(12)：



【0039】(式(2)中、R1は、水素原子(H)、ハロゲン原子、-CN、-NO<sub>2</sub>、-CF<sub>3</sub>、-C<sub>2</sub>F<sub>5</sub>、-C<sub>3</sub>F<sub>7</sub>から選択される基であり、qは、1~8の整数から選択される；式(3)中、R2は、水素原子(H)、ハロゲン原子、-CN、-NO<sub>2</sub>、-CF<sub>3</sub>、-C<sub>2</sub>F<sub>5</sub>、-C<sub>3</sub>F<sub>7</sub>から選択される基であり、rは、1~8の整数から選択される；式(4)中、R3は、水素原子(H)、ハロゲン原子、-CN、-NO<sub>2</sub>、-CF<sub>3</sub>、-C<sub>2</sub>F<sub>5</sub>、-C<sub>3</sub>F<sub>7</sub>から選択される基であり、sは、1~8の整数から選択される)で表される

【0034】

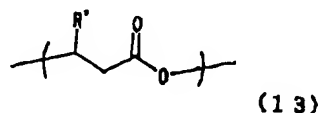
【化23】



【0035】(式(12)中、Rは、下記一般式(2)、一般式(3)、あるいは一般式(4)のいずれかで示される基から選択される少なくとも1つ以上の基である)で表されるアルカノエートと酵母エキスをを含む培地で微生物を培養し、微生物菌体からポリヒドロキシアルカノエートを抽出して、下記式(13)：

【0036】

【化24】



【0037】(式(13)中、R'は、上記式(12)においてRとして選択された基、ならびに、このRとして選択された基が、下記式(2)で示され、 $q=q_0$ の基である場合、対応するR1を有し、 $q=q_0-2$ 、 $q=q_0-4$ 、あるいは $q=q_0-6$ の基、下記式(3)で示され、 $r=r_0$ の基である場合、対応するR2を有し、 $r=r_0-2$ 、 $q=r_0-4$ 、あるいは $r=r_0-6$ の基、下記式(4)で示され、 $s=s_0$ の基である場合、対応するR3を有し、 $s=s_0-2$ 、 $s=s_0-4$ 、あるいは $s=s_0-6$ の基、から選択される少なくとも1つ以上の基である。なお、 $q_0-2$ 、 $r_0-2$ あるいは $s_0-2$ 、 $q_0-4$ 、 $r_0-4$ あるいは $s_0-4$ 、 $q_0-6$ 、 $r_0-6$ あるいは $s_0-6$ は、1以上の整数値のみを取り得る)

【0038】

【化25】

モノマーユニットを有するポリヒドロキシアルカノエートを取得することを特徴とする製造方法である。特に、上記一般式(13)で表されるモノマーユニットからなるポリヒドロキシアルカノエートを取得することを特徴とする製造方法である。

【0040】この方法においては、原料となる式(12)で表されるアルカノエートを一種類とし、対応するモノマーユニット、場合によっては、付随する炭素鎖の減少した副生モノマーユニットをも含む、PHAを製造

(3) 101-288256 (P2001-288256A)

することができる。また、上述するように、原料となる式(12)で表されるアルカノエートは培養時に複数種を用いることもでき、その際には、生成されるポリマーにおいて必要とする機能、物性などを考慮した上、適当な種類数を用いることが好ましい。一般には、式(12)で表されるアルカノエートを5種類程度まで原料に用いることで、前記の目的を十分に達成することが期待できる。さらに、機能性、物性を微妙に制御することを目的として、5種類以上の多くの種類の原料を利用することも可能である。例えば、上記の一般式(2)、一般式(3)ならびに一般式(4)の三種をいずれをも含み、それぞれ3種類程度までを選択し、合計して、5種類を超える原料を用いることも可能である。

【0041】また、一般式(2)におけるベンゼン環上の置換基R1、ならびに一般式(3)におけるベンゼン環上の置換基R2は、オルト位(2位または6位)、メタ位(3位または5位)ならびにパラ位(4位)のいずれを選択することも可能である。得られるポリヒドロキシアルカノエートは、対応する置換ベンゼン環を有するモノマーユニットを含むものとなる。何れの異性体を原料に選択するかは、目的とする機能性、物性に依りて、適宜選択されるものである。なお、前記の機能性、物性における相違が問題とならない場合、ベンゼン環上パラ位(4位)に置換基を有するものが、通常、収率あるいはポリマー中への取り込まれ易さの点において、無置換のものと遜色なく、より好適に用いることができる。同じく、一般式(4)のシクロヘキシル環上、R3の置換位置は、1位、2位(または6位)、3位(または5位)ならびに4位のいずれを選択することも可能であり、加えて、cis配置とtrans配置のどちらをも選択可能である。得られるポリヒドロキシアルカノエートは、対応する置換シクロヘキシル環を有するモノマーユニットを含むものとなる。何れの異性体を原料に選択するかは、目的とする機能性、物性に依りて、適宜選択されるものである。なお、前記の機能性、物性における相違が問題とならない場合、シクロヘキシル環上4位に置換基を有するものが、通常、収率あるいはポリマー中への取り込まれ易さの点において、無置換のものと遜色なく、より好適に用いることができる。なお、かかる微生物により生産されるポリヒドロキシアルカノエートは、そのモノマーユニットの3位の炭素原子は、キラル中心となるが、一般に、R-体のみから構成されるポリマーであり、従って、アイソタクチックなポリマーである。その結果、かかる方法で生産されるPHAは、生分解性を有するポリマーとなる。

【0042】本発明の方法において、微生物の培養は、式(12)のアルカノエートと酵母エキスを含有する培地で一旦培養した後、培養された菌体を、当該アルカノエートを含み、窒素源を制限した培地においてさらに培養する、二段階の培養とすることができる。また、微生物

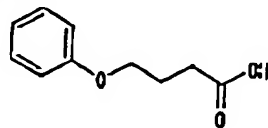
の培養を、式(12)のアルカノエートと酵母エキスを含有する培地のみで行う一段階の培養とすることもできる。加えて、利用する微生物を、シュードモナス属(*Pseudomonas* sp.)に属する微生物から選択すると好ましい。好適に利用可能なシュードモナス属(*Pseudomonas* sp.)に属する菌株として、例えば、シュードモナス チコリアイ・YN2株(*Pseudomonas cichorii* YN2; FERM P-17411)、シュードモナス・チコリアイ・H45株(*Pseudomonas cichorii* H45, FERM P-17410)、シュードモナス・プチダ・P91株(*Pseudomonas putida* P91, FERM P-17409)、シュードモナス・ジェッセニイ・P161株(*Pseudomonas jessenii* P161, FERM P-17445)を挙げることができ、前記4種の菌株のいずれかを選択するとより好ましい。

【0043】以下に、本発明のポリヒドロキシアルカノエートの製造方法における第一の形態における、好ましい発明の態様を個別的に、より具体的に記載する。

【0044】本発明者らは、下記式(14)：

【0045】

【化26】

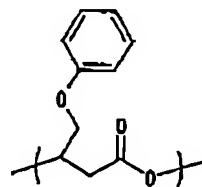


(14)

【0046】で表される4-フェノキシ酪酸(PxB A)と酵母エキスを含有する培地で培養することで、下記式(5)：

【0047】

【化27】



(5)

【0048】で表される3-ヒドロキシ-4-フェノキシ酪酸(3HPxB)モノマーユニットからなるポリ-3-ヒドロキシ-4-フェノキシ酪酸(PHPxB)ホモポリマーを製造し得る微生物を得ることに成功した。

【0049】すなわち、本発明のポリヒドロキシアルカノエートの製造方法による、前記第一の形態に含まれる、一つの態様は、上記式(14)で表されるPxB Aと酵母エキスを含有する培地で、PxB Aを利用して上記式(5)で示される3HPxBモノマーユニットの繰返し単位からなるPHPxBホモポリマーを生産する微生物

(4) 01-288256 (P2001-288256A)

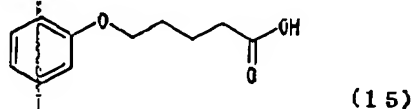
物を培養する工程を有することを特徴とする方法である。

【0050】これまでにP×BAを基質とした、3HP×Bをモノマーユニットとして含むポリヒドロキシアルカノエートの微生物生産の報告例はなく、また、PHP×Bのホモポリマーであるポリヒドロキシアルカノエートの微生物生産に関する報告例もない。従って、上記方法で得られるPHP×Bは新規であり、本発明が提供する新規なポリヒドロキシアルカノエートの発明に含まれる。

【0051】本発明者らは、また、下記式(15)：

【0052】

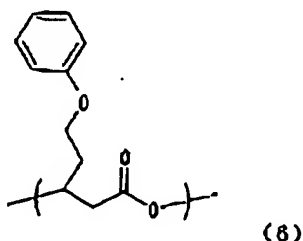
【化28】



【0053】で表される5-フェノキシ吉草酸(P×VA)と酵母エキスを含む培地で培養することで、下記式(6)：

【0054】

【化29】



【0055】で表される3-ヒドロキシ-5-フェノキシ吉草酸(3HP×V)モノマーユニットからなるホモポリマーを製造し得る微生物を得ることに成功した。

【0056】すなわち、前記第一の形態に含まれる、更なる一つの態様は、上記式(15)で表されるP×VAと酵母エキスを含む培地で、P×VAを利用して上記式(6)で示される3HP×Vモノマーユニットの繰返し単位からなるポリ-3-ヒドロキシ-5-フェノキシ吉草酸(PHP×V)ホモポリマーを生産する微生物を培養する工程を有することを特徴とする方法である。

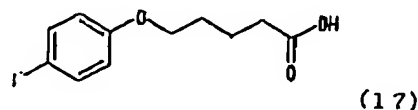
【0057】これまでにP×VAを基質とした、3HP×Vをモノマーユニットとして含むポリヒドロキシアルカノエートの微生物生産の報告例はなく、また、PHP×Vのホモポリマーであるポリヒドロキシアルカノエートの微生物生産に関する報告例もない。従って、上記方法で得られるPHP×Vは新規であり、本発明が提供する

る新規なポリヒドロキシアルカノエートの発明に含まれる。

【0058】本発明者らは、また、下記式(17)：

【0059】

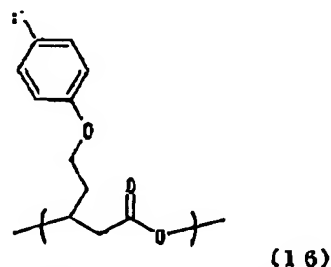
【化30】



【0060】で表される5-(4-フルオロフェノキシ)吉草酸(FP×VA)と酵母エキスを含む培地で培養することで下記式(16)：

【0061】

【化31】



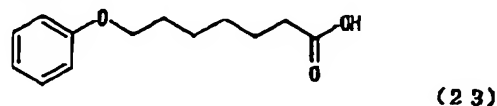
【0062】で表される3-ヒドロキシ-5-(フルオロフェノキシ)吉草酸(3HFP×V)モノマーユニットからなるホモポリマーを製造し得る微生物を得ることに成功した。

【0063】すなわち、前記第一の形態に含まれる、更なる一つの態様は、上記式(17)で表されるFP×VAと酵母エキスを含む培地で、FP×VAを利用して上記式(16)で示される3HFP×Vモノマーユニットの繰返し単位からなるポリ-3-ヒドロキシ-5-(フルオロフェノキシ)吉草酸(PHP×V)ホモポリマーを生産する微生物を培養する工程を有することを特徴とする方法である。

【0064】本発明者らは、また、下記式(23)：

【0065】

【化32】

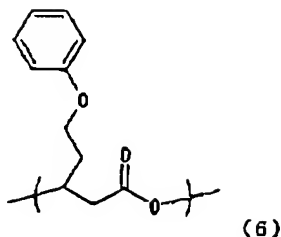


【0066】で表される7-フェノキシヘプタン酸(P×HPA)と酵母エキスを含む培地で培養することで下記式(6)及び(22)：

【0067】

【化33】

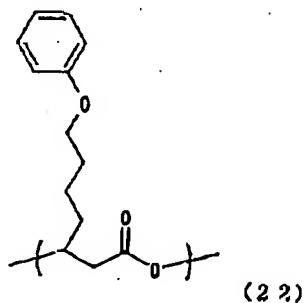
(15) 101-288256 (P2001-288256A)



【0068】で表される3-ヒドロキシ-5-フェノキシ吉草酸 (3HPxV) 及び3-ヒドロキシ-7-フェノキシヘプタン酸 (3HPxHp) ユニットからなるコポリマーを生産できる微生物を微生物を得ることに成功した。

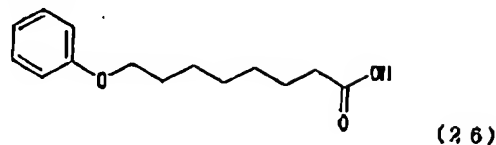
【0069】すなわち、前記第一の形態に含まれる、更なる一つの態様は、上記式(23)で表されるPxHpAと酵母エキスとを含む培地で、PxHpAを利用して上記式(6)及び(22)で示される3HPxV及び3HPxHpモノマーユニットからなるポリヒドロキシアリカノエートコポリマーを生産する微生物を培養する工程を有することを特徴とする方法である。

【0070】本発明者らは、また、下記式(26)：



【0071】

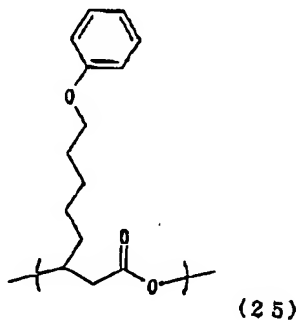
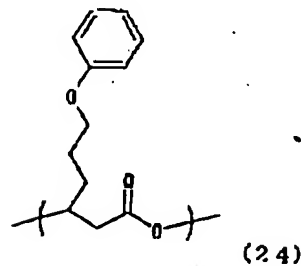
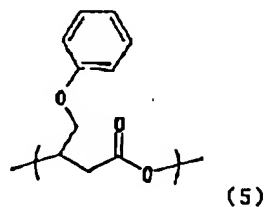
【化34】



【0072】で表される8-フェノキシオクタン酸 (PxOA) と酵母エキスとを含む培地で培養することで下記式(5)、(24)及び(25)：

【0073】

【化35】



【0074】で表される3-ヒドロキシ-4-フェノキシ酪酸 (3HPxB)、3-ヒドロキシ-6-フェノキシヘキサン酸 (3HPxHx) 及び3-ヒドロキシ-8-フェノキシオクタン酸 (3HPxO) ユニットからなるコポリマーを生産できる微生物を得ることに成功した。

【0075】すなわち、前記第一の形態に含まれる、更なる一つの態様は、上記式(26)で表されるPxOAと酵母エキスとを含む培地で、PxOAを利用して上記

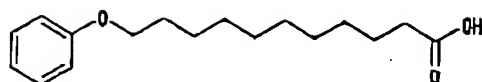
式(5)、(24)及び(25)で示される3HPxB、3HPxHx及び3HPxOモノマーユニットからなるポリヒドロキシアリカノエートコポリマーを生産する微生物を培養する工程を有することを特徴とする方法である。

【0076】本発明者らは、また、下記式(28)：

【0077】

【化36】

(包6) 01-288256 (P2001-288256A)

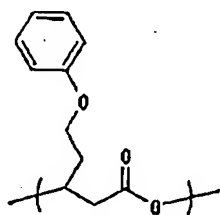


(28)

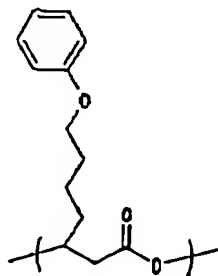
【0078】で表される11-フェノキシウンデカン酸 (PxUDA) と酵母エキスを含む培地で培養することによって下記式(6)、(22)及び(27)：

【0079】

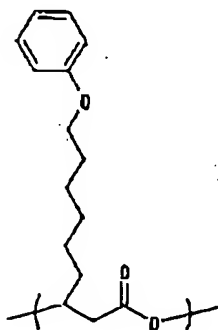
【化37】



(6)



(22)



(27)

【0080】で表される3-ヒドロキシ-5-フェノキシ吉草酸 (3HPxV)、3-ヒドロキシ-7-フェノキシヘプタン酸 (3HPxHp) 及び3-ヒドロキシ-9-フェノキシノナン酸 (3HPxN) ユニットからなるコポリマーを生産できる微生物を得ることに成功した。

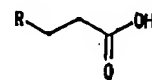
【0081】すなわち、前記第一の形態に含まれる、更なる一つの態様は、上記式(28)で表されるPxUDAと酵母エキスを含む培地で、PxUDAを利用して上記式(6)、(22)及び(27)で示される3HPxV、3HPxHp及び3HPxNモノマーユニットからなるポリヒドロキシアルカノエートコポリマーを生産する微生物を培養する工程を有することを特徴とする方法である。

【0082】さらには、上記の一連の態様に詳述した方法に加えて、フェノキシ基を有する側鎖を所望とする基で置換した下記式(12)のアルカノエートをモノマー成分の原料として、対応する種々の側鎖を有するポリヒドロキシアルカノエートを、微生物を利用して選択的に生産することができる。原料として、かかる下記式(12)のアルカノエートを利用し、下記式(13)で示されるモノマーユニット組成を有するポリヒドロキシアル

カノエートの製造方法も、本発明のポリヒドロキシアルカノエートの製造方法による、前記第一の形態に含まれる。

【0083】

【化38】

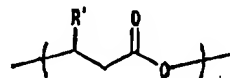


(12)

【0084】(式(12)中、Rは、下記一般式(3)で表される基から選択される少なくとも1つ以上の基である)

【0085】

【化39】



(13)

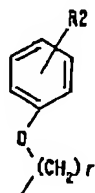
【0086】(式(13)中、R'は、上記式(12)においてRとして選択された基、ならびに、このRとして選択された基が、下記式(3)で示され、 $r=r_0$ の基である場合、対応するR2を有し、 $r=r_0-2$ 、 $q=r_0-4$ 、あるいは $r=r_0-6$ の基、から選択される

(17) 101-288256 (P2001-288256A)

少なくとも1つ以上の基である。なお、 $r_0-2$ 、 $r_0-4$ あるいは $r_0-6$ は、1以上の整数値のみを取り得る)

【0087】

【化40】



(3)

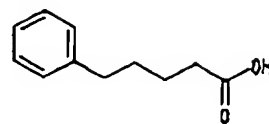
【0088】(式(3)中、 $R_2$ は、水素原子(H)、ハロゲン原子、 $-CN$ 、 $-NO_2$ 、 $-CF_3$ 、 $-C_2F_5$ 、 $-C_3F_7$ から選択される基であり、 $r$ は、1~8の整数から選択される)多くの場合、原料となる式(12)で表されるアルカノエートを一種類とし、対応するモノマーユニット、場合によっては、付随する炭素鎖の減少した副生モノマーユニットをも含む、PHAを製造する。一方では、上述するように、原料となる式(12)で表されるアルカノエートは培養時に複数種を用いることができ、生成されるポリマーにおいて必要とする機能、物性などを考慮した上、適当な種類数を用いることが好ましい。一般には、式(12)で表されるアルカノエートを3種類程度まで原料に用いることで、前記の目的を十分に達成することが期待できる。さらに、機能性、物性を微妙に制御することを目的として、3種類以上の多くの種類の原料を利用することも可能である。

【0089】また、原料において、式(3)のベンゼン環上、 $R_2$ の置換位置は、オルト位(2位または6位)、メタ位(3位または5位)ならびにパラ位(4位)のいずれを選択することも可能である。得られるポリヒドロキシアルカノエートは、対応する置換フェノキシ基を有するモノマーユニットを含むものとなる。何れの異性体を原料に選択するかは、目的とする機能性、物性に依りて、適宜選択されるものである。なお、前記の機能性、物性における相違が問題とならない場合、ベンゼン環上パラ位(4位)に置換基を有するものが、通常、収率あるいはポリマー中への取り込まれ易さの点において、無置換のものと同色なく、より好適に用いることができる。なお、かかる微生物により生産されるポリヒドロキシアルカノエートは、そのモノマーユニットの3位の炭素原子は、キラル中心となるが、一般に、 $R$ -体のみから構成されるポリマーであり、従って、アイソタクチックなポリマーである。その結果、かかる方法で生産されるPHAは、生分解性を有するポリマーとなる。

【0090】さらに、本発明者らは、下記式(18)：

【0091】

【化41】

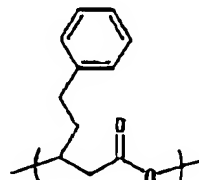


(18)

【0092】で表される5-フェニル吉草酸(PVA)と酵母エキスを含む培地で培養することで、下記式(9)：

【0093】

【化42】



(9)

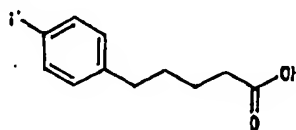
【0094】で表される3-ヒドロキシ-5-フェニル吉草酸(3HPV)モノマーユニットからなるホモポリマーを製造し得る微生物を得ることに成功した。

【0095】すなわち、前記第一の形態に含まれる、別の一つの態様は、上記式(18)で表されるPVAと酵母エキスを含む培地で、PVAを利用して上記式(9)で示される3HPVモノマーユニットの繰返し単位からなるポリ-3-ヒドロキシ-5-フェニル吉草酸(PHPV)ホモポリマーを生産する微生物を培養する工程を有することを特徴とする方法である。

【0096】本発明者らは、また、下記式(19)：

【0097】

【化43】

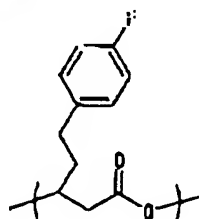


(19)

【0098】で表される5-(4-フルオロフェニル)吉草酸(FPVA)と酵母エキスを含む培地で培養することで、下記式(7)：

【0099】

【化44】



(7)

【0100】で表される3-ヒドロキシ-5-(4-フルオロフェニル)吉草酸(3HFVPV)モノマーユニットからなるホモポリマーを製造し得る微生物を得ること

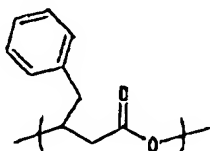


(18) 01-288256 (P2001-288256A)

に成功した。

【0101】すなわち、前記第一の形態に含まれる、更なる一つの態様は、上記式(19)で表されるFPVAと酵母エキスとを含む培地で、FPVAを利用して上記式(7)で示される3HFPVモノマーユニットの繰返し単位からなるポリ-3-ヒドロキシ-5-(4-フルオロフェニル)吉草酸(PHFPV)ホモポリマーを生産する微生物を培養する工程を有することを特徴とする方法である。

【0102】これまでに、FPVAを基質とした、3HFPVをモノマーユニットとして含むポリヒドロキシアルカノエートの微生物生産の報告例はなく、また、PHFPVのホモポリマーであるポリヒドロキシアルカノエートの微生物生産に関する報告例もない。従って、上記方法で得られるPHFPVは新規であり、本発明が提供



(10)

【0107】で表される3-ヒドロキシ-4-フェニル酪酸(3HPB)及び3-ヒドロキシ-6-フェニルヘキサン酸(3HPHx)ユニットからなるコポリマーを生産できる微生物を得ることに成功した。

【0108】すなわち、前記第一の形態に含まれる、更なる一つの態様は、上記式(21)で表されるPHxAと酵母エキスとを含む培地で、PHxAを利用して上記式(10)及び(11)で示される3HPB及び3HPHxモノマーユニットからなるポリヒドロキシアルカノエートコポリマーを生産する微生物を培養する工程を有することを特徴とする方法である。

【0109】これまでにPHxAを基質とした、3HPB及び3HPHxモノマーユニットを含むポリヒドロキシアルカノエートの微生物生産の報告例はなく、また、3HPB及び3HPHxモノマーユニットからなるポリヒドロキシアルカノエートの微生物生産に関する報告例もない。従って、上記方法で得られる3HPB及び3HPHxモノマーユニットからなるポリヒドロキシアルカノエートは新規であり、本発明が提供する新規なポリヒドロキシアルカノエートの発明に含まれる。

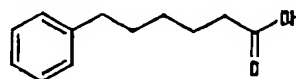
【0110】さらには、上記の一連の態様に詳述した方法に加えて、フェニル基を有する側鎖を所望とする基で置換した下記式(12)のアルカノエートをモノマー成分の原料として、対応する種々の側鎖を有するポリヒドロキシアルカノエートを、微生物を利用して選択的に製造することができる。原料として、かかる下記式(12)のアルカノエートを利用し、下記式(13)で示されるモノマーユニット組成を有するポリヒドロキシアル

する新規なポリヒドロキシアルカノエートの発明に含まれる。

【0103】本発明者らは、また、下記式(21)：

【0104】

【化45】

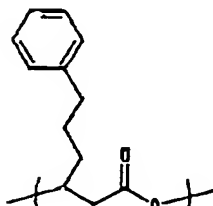


(21)

【0105】で表される6-フェニルヘキサン酸(PHxA)と酵母エキスとを含む培地で培養することで下記式(10)及び(11)：

【0106】

【化46】

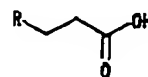


(11)

カノエートの製造方法も、本発明のポリヒドロキシアルカノエートの製造方法による、前記第一の形態に含まれる。

【0111】

【化47】

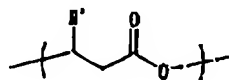


(12)

【0112】(式(12)中、Rは、下記一般式(2)で表される基から選択される少なくとも1つ以上の基である)

【0113】

【化48】



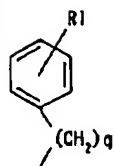
(13)

【0114】(式(13)中、R'は、上記式(12)においてRとして選択された基、ならびに、このRとして選択された基が、下記式(2)で示され、 $q=q_0$ の基である場合、対応するR1を有し、 $q=q_0-2$ 、 $q=q_0-4$ 、あるいは $q=q_0-6$ の基、から選択される少なくとも1つ以上の基である。なお、 $q_0-2$ 、 $q_0-4$ 、あるいは $q_0-6$ は、1以上の整数値のみを取り得る)

【0115】

【化49】

(19) 01-288256 (P2001-288256A)



(2)

【0115】式(2)中、R1は、水素原子(H)、ハロゲン原子、-CN、-NO<sub>2</sub>、-CF<sub>3</sub>、-C<sub>2</sub>F<sub>5</sub>、-C<sub>3</sub>F<sub>7</sub>から選択される基であり、qは、1~8の整数から選択される。多くの場合、原料となる式(12)で表されるアルカノエートを一種類とし、対応するモノマーユニット、場合によっては、付随する炭素鎖の減少した副生モノマーユニットを含む、PHAを製造する。一方で、上述するように、原料となる式(12)で表されるアルカノエートは培養時に複数種を用いることができ、生成されるポリマーにおいて必要とする機能、物性などを考慮した上、適当な種類数を用いることが好ましい。一般には、式(12)で表されるアルカノエートを3種類程度まで原料に用いることで、前記の目的を十分に達成することが期待できる。さらに、機能性、物性を微妙に制御することを目的として、3種類以上の多くの種類の原料を利用することも可能である。

【0117】また、原料において、式(2)のベンゼン環上、R1の置換位置は、オルト位(2位または6位)、メタ位(3位または5位)ならびにパラ位(4位)のいずれを選択することも可能である。得られるポリヒドロキシアルカノエートは、対応する置換フェニル基を有するモノマーユニットを含むものとなる。何れの異性体を原料に選択するかは、目的とする機能性、物性に依りて、適宜選択されるものである。なお、前記の機能性、物性における相違が問題とならない場合、ベンゼン環上パラ位(4位)に置換基を有するものが、通常、収率あるいはポリマー中への取り込まれ易さの点において、無置換のものと同様でなく、より好適に用いることができる。なお、かかる微生物により生産されるポリヒドロキシアルカノエートは、そのモノマーユニットの3位の炭素原子は、キラル中心となるが、一般に、R-体のみから構成されるポリマーであり、従って、アイソタクチックなポリマーである。その結果、かかる方法で生産されるPHAは、生分解性を有するポリマーとなる。

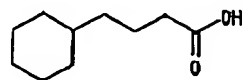
【0118】さらに、本発明者らは、基質として4-シクロヘキシル酪酸(CHBA)を用い、CHBA及び酵母エキスを含有する培地中で、微生物を培養してポリヒドロキシアルカノエートを生産させ、菌体内に蓄積させると、そのポリヒドロキシアルカノエートは、モノマーユニット中に、3-ヒドロキシ-4-シクロヘキシル酪酸(3HCHB)を高い比率で含むことを見出し、また、収率も十分に高いものであることを見出した。また、取得した3HCHBを含むポリヒドロキシアルカノエートについて、精製処理を行うことにより、3HCHB

Bモノマーユニットの繰返し単位からなるPHCHBホモポリマーを分離可能であることを見出した。

【0119】すなわち、前記第一の形態に含まれる、別の一つの態様は、3HCHBモノマーユニットからなるポリ-3-ヒドロキシ-4-シクロヘキシル酪酸(PHCHB)の製造方法であり、下記式(20)：

【0120】

【化50】

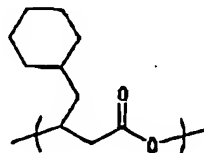


(20)

【0121】で表されるCHBAおよび酵母エキスを含有する培地で微生物を培養する工程を含むことを特徴とする、下記式(8)：

【0122】

【化51】



(8)

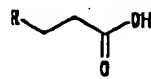
【0123】で表される3HCHBモノマーユニットからなるPHCHBホモポリマーの製造方法である。

【0124】これまでに、PHCHBのホモポリマーであるポリヒドロキシアルカノエートの微生物生産に関する報告例はない。従って、上記方法で得られるPHCHBは新規であり、本発明が提供する新規なポリヒドロキシアルカノエートの発明に含まれる。

【0125】さらには、前記の態様に詳述した方法に加えて、シクロヘキシル基を有する側鎖を所望とする基で置換した下記式(12)のアルカノエートをモノマー成分の原料として、対応する種々の側鎖を有するポリヒドロキシアルカノエートを、微生物を利用して選択的に製造することができる。原料として、かかる下記式(12)のアルカノエートを利用し、下記式(13)で示されるモノマーユニット組成を有するポリヒドロキシアルカノエートの製造方法も、本発明のポリヒドロキシアルカノエートの製造方法による、前記第一の形態に含まれる。

【0126】

【化52】



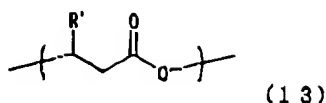
(12)

【0127】式(12)中、Rは、下記一般式(4)で表される基から選択される少なくとも1つ以上の基である)

【0128】

(20) 101-288256 (P2001-288256A)

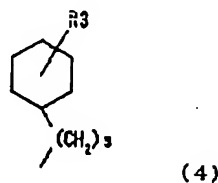
【化53】



【0129】(式(13)中、 $R'$ は、上記式(12)において $R$ として選択された基、ならびに、この $R$ として選択された基が、下記式(4)で示され、 $s=s_0$ の基である場合、対応する $R3$ を有し、 $s=s_0-2$ 、 $s=s_0-4$ 、あるいは $s=s_0-6$ の基、から選択される少なくとも1つ以上の基である。なお、 $s_0-2$ 、 $s_0-4$ 、あるいは $s_0-6$ は、1以上の整数値のみを取り得る)

【0130】

【化54】



【0131】(式(4)中、 $R3$ は、水素原子(H)、ハロゲン原子、 $-CN$ 、 $-NO_2$ 、 $-CF_3$ 、 $-C_2F_5$ 、 $-C_3F_7$ から選択される基であり、 $s$ は、1~8の整数から選択される)多くの場合、原料となる式(12)で表されるアルカノエートを一種類とし、対応するモノマーユニット、場合によっては、付随する炭素鎖の減少した副生モノマーユニットをも含む、PHAを製造する。一方では、上述するように、原料となる式(12)で表されるアルカノエートは培養時に複数種を用いることができ、生成されるポリマーにおいて必要とする機能、物性などを考慮した上、適当な種類数を用いることが好ましい。一般には、式(12)で表されるアルカノエートを3種類程度まで原料に用いることで、前記の目的を十分に達成することが期待できる。さらに、機能性、物性を微妙に制御することを目的として、3種類以上の多くの種類の原料を利用することも可能である。

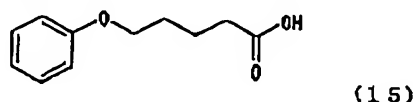
【0132】また、原料において、式(4)のシクロヘキシル環上、 $R3$ の置換位置は、1位、2位(または6位)、3位(または5位)ならびに4位のいずれを選択することも可能であり、加えて、*cis*配置と*trans*配置のどちらをも選択可能である。得られるポリヒドロキシアルカノエートは、対応する置換シクロヘキシル環を有するモノマーユニットを含むものとなる。何れの異性体を原料に選択するかは、目的とする機能性、物性に依りて、適宜選択されるものである。なお、前記の機能性、物性における相違が問題とならない場合、シクロヘキシル環上4位に置換基を有するものが、通常、収率あるいはポリマー中への取り込まれ易さの点において、無置換のものと遜色なく、より好適に用いることができ

る。なお、かかる微生物により生産されるポリヒドロキシアルカノエートは、そのモノマーユニットの3位の炭素原子は、キラル中心となるが、一般に、 $R$ -体のみから構成されるポリマーであり、従って、アイソタクチックなポリマーである。その結果、かかる方法で生産されるPHAは、生分解性を有するポリマーとなる。

【0133】さらに、本発明者らは、下記式(15)：

【0134】

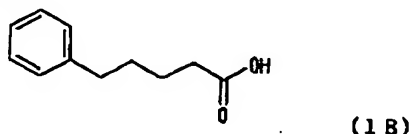
【化55】



【0135】で表される5-フェノキシ吉草酸( $PxV$ A)及び下記式(18)：

【0136】

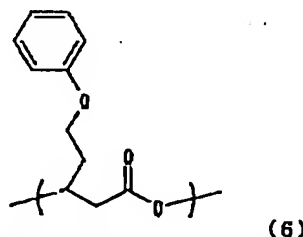
【化56】



【0137】で表される5-フェニル吉草酸( $PVA$ )と酵母エキスとを含む培地で培養することで、下記式(6)：

【0138】

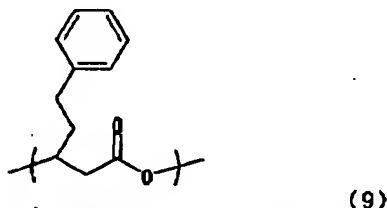
【化57】



【0139】で表される3-ヒドロキシ-5-フェノキシ吉草酸(3HPxV)モノマーユニット及び下記式(9)：

【0140】

【化58】



【0141】で表される3-ヒドロキシ-5-フェニル吉草酸(3HPV)モノマーユニットからなるコポリマーを製造し得る微生物を得ることに成功した。

【0142】すなわち、前記第一の形態に含まれる、別の一つの態様は、上記式(15)及び(18)で表され

(21) 01-288256 (P2001-288256A)

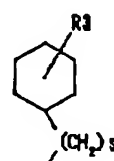
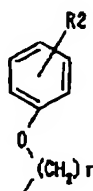
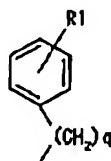
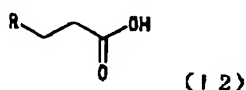
るP×VA及びPVAと酵母エキスとを含む培地で、P×VA及びPVAを利用して上記式(6)及び(9)で示される3HP×Vモノマーユニット及び3HPVモノマーユニットの繰返し単位からなるポリ(3-ヒドロキシ-5-フェノキシ吉草酸/3-ヒドロキシ-5-フェニル吉草酸)コポリマーを生産する微生物を増養する工程を有することを特徴とする方法である。

【0143】これまでにP×VA及びPVAを基質とした、3HP×V及び3HPVモノマーユニットを含むポリヒドロキシアルカノエートの微生物生産の報告例はなく、また、3HP×V及び3HPVモノマーユニットからなるポリヒドロキシアルカノエートの微生物生産に関する報告例もない。従って、上記方法で得られる3HP×V及び3HPVモノマーユニットからなるポリヒドロキシアルカノエートは新規であり、本発明が提供する新規なポリヒドロキシアルカノエートの発明に含まれる。

【0144】さらには、前記の態様に詳述した方法に加えて、下記式(12)のアルカノエートのうちから選択される、複数種の原料アルカノエートを利用し、対応する種々の側鎖を有するモノマーユニット複数種を含むポリヒドロキシアルカノエートを、微生物を利用して選択的に製造することができる。すなわち、本発明のポリヒドロキシアルカノエートの製造方法の第一の形態は、複数種の原料アルカノエートを利用し、対応する種々の側鎖を有するモノマーユニット複数種を含むポリヒドロキシアルカノエートの製造方法の態様をも含む。すなわち、下記式(12)：

【0145】

【化59】

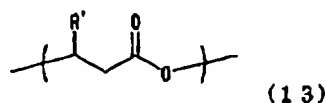


【0150】(式(2)中、R1は、水素原子(H)、ハロゲン原子、-CN、-NO<sub>2</sub>、-CF<sub>3</sub>、-C<sub>2</sub>F<sub>5</sub>、-C<sub>3</sub>F<sub>7</sub>から選択される基であり、qは、1~8の整数から選択される；式(3)中、R2は、水素原子(H)、ハロゲン原子、-CN、-NO<sub>2</sub>、-CF<sub>3</sub>、-C<sub>2</sub>F<sub>5</sub>、-C<sub>3</sub>F<sub>7</sub>から選択される基であり、rは、1~8の整数から選択される；式(4)中、R3は、水素原子(H)、ハロゲン原子、-CN、-NO<sub>2</sub>、-CF<sub>3</sub>、-C<sub>2</sub>F<sub>5</sub>、-C<sub>3</sub>F<sub>7</sub>から選択される基であり、sは、1~8の整数から選択される)で表される少なくとも1以上のモノマーユニットを有するポリヒド

【0146】(式(12)中、Rは、下記一般式(2)、一般式(3)、あるいは一般式(4)のいずれかで示される基から選択される少なくとも1つ以上の基である)で表されるアルカノエートと酵母エキスとを含む培地で微生物を培養し、微生物菌体からポリヒドロキシアルカノエートを抽出して、下記式(13)：

【0147】

【化60】



【0148】(式(13)中、R'は、上記式(12)においてRとして選択された基、ならびに、このRとして選択された基が、下記式(2)で示され、 $q=q_0$ の基である場合、対応するR1を有し、 $q=q_0-2$ 、 $q=q_0-4$ 、あるいは $q=q_0-6$ の基、下記式(3)で示され、 $r=r_0$ の基である場合、対応するR2を有し、 $r=r_0-2$ 、 $r=r_0-4$ 、あるいは $r=r_0-6$ の基、下記式(4)で示され、 $s=s_0$ の基である場合、対応するR3を有し、 $s=s_0-2$ 、 $s=s_0-4$ 、あるいは $s=s_0-6$ の基、から選択される少なくとも1つ以上の基である。なお、 $q_0-2$ 、 $r_0-2$ あるいは $s_0-2$ 、 $q_0-4$ 、 $r_0-4$ あるいは $s_0-4$ 、 $q_0-6$ 、 $r_0-6$ あるいは $s_0-6$ は、1以上の整数値のみを取り得る)

【0149】

【化61】

ロキシアルカノエートを取得することを特徴とする製造方法である。特に、原料とする少なくとも1以上のアルカノエートに対応した側鎖を保持するモノマーユニットからなるポリヒドロキシアルカノエートを取得することを特徴とする製造方法である。つまり、複数種の原料アルカノエートを利用する際にも、ポリヒドロキシアルカノエート中に取り込まれうるモノマーユニットとして、選択された式(12)に示すアルカノエート複数種に応じて、モノマーユニットの側鎖構造が各アルカノエートに対応した少なくとも1つ以上の側鎖構造を有する

(22) 01-288256 (P2001-288256A)

ことを特徴とするモノマーユニットを有する、特に、各アルカノエートに由来する各一種のモノマーユニットからなるポリヒドロキシアルカノエートの製造方法である。

【0151】この方法においては、原料となる式(12)で表されるアルカノエートを一種類とし、対応するモノマーユニット、場合によっては、付随する炭素鎖の減少した副生モノマーユニットをも含む、PHAを製造することができる。また、上述するように、原料となる式(12)で表されるアルカノエートは培養時に複数種を用いることもでき、その際には、生成されるポリマーにおいて必要とする機能、物性などを考慮した上、適当な種類数を用いることが好ましい。一般には、式(12)で表されるアルカノエートを5種類程度まで原料に用いることで、前記の目的を十分に達成することが期待できる。さらに、機能性、物性を微妙に制御することを目的として、5種類以上の多くの種類の原料を利用することも可能である。例えば、上記の一般式(2)、一般式(3)ならびに一般式(4)の三種をいずれをも含み、それぞれ3種類程度までを選択し、合計して、5種類を超える原料を用いることも可能である。

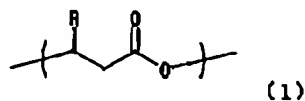
【0152】また、一般式(2)におけるベンゼン環上の置換基R1、ならびに一般式(3)におけるベンゼン環上の置換基R2は、オルト位(2位または6位)、メタ位(3位または5位)ならびにパラ位(4位)のいずれを選択することも可能である。得られるポリヒドロキシアルカノエートは、対応する置換ベンゼン環を有するモノマーユニットを含むものとなる。何れの異性体を原料に選択するかは、目的とする機能性、物性に応じて、適宜選択されるものである。なお、前記の機能性、物性における相違が問題とならない場合、ベンゼン環上パラ位(4位)に置換基を有するものが、通常、収率あるいはポリマー中への取り込まれ易さの点において、無置換のものと同色なく、より好適に用いることができる。同じく、一般式(4)のシクロヘキシル環上、R3の置換位置は、1位、2位(または6位)、3位(または5位)ならびに4位のいずれを選択することも可能であり、加えて、cis配置とtrans配置のどちらをも選択可能である。得られるポリヒドロキシアルカノエー

トは、対応する置換シクロヘキシル環を有するモノマーユニットを含むものとなる。何れの異性体を原料に選択するかは、目的とする機能性、物性に応じて、適宜選択されるものである。なお、前記の機能性、物性における相違が問題とならない場合、シクロヘキシル環上4位に置換基を有するものが、通常、収率あるいはポリマー中への取り込まれ易さの点において、無置換のものと同色なく、より好適に用いることができる。なお、かかる微生物により生産されるポリヒドロキシアルカノエートは、そのモノマーユニットの3位の炭素原子は、キラル中心となるが、一般に、R-体のみから構成されるポリマーであり、従って、アイソタクチックなポリマーである。その結果、かかる方法で生産されるPHAは、生分解性を有するポリマーとなる。

【0153】以上に代表的な態様を示して、詳述してきたように、本発明のポリヒドロキシアルカノエートの製造方法においては、原料として、アルカノエートの側鎖を所望とする基で置換した誘導体を用いることで、モノマー成分として、対応する種々の側鎖を有するポリヒドロキシアルカノエートを、微生物を利用して選択的に製造することができる。従って、本発明は、かかる方法により得られる、下記一般式(1)で示されるモノマーユニット組成を有するポリヒドロキシアルカノエートの発明も提供する。すなわち、本発明にかかる新規なポリヒドロキシアルカノエートは、下記一般式(1)で示されるモノマーユニットからなるポリヒドロキシアルカノエートである。

【0154】

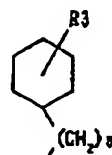
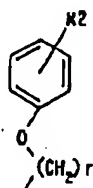
【化62】



【0155】式(1)中、Rは、下記一般式(2)、一般式(3)、あるいは一般式(4)のいずれかで示される基から選択される少なくとも1つ以上の基である)

【0156】

【化63】



【0157】式(2)中、R1は、水素原子(H)、ハロゲン原子、-CN、-NO2、-CF3、-C2F5、-C2F7から選択される基であり、qは、1~8の整数から選択さ

れる；式(3)中、R2は、水素原子(H)、ハロゲン原子、-CN、-NO2、-CF3、-C2F5、-C2F7から選択される基であり、rは、1~8の整数から選択される；式

(23) 01-288256 (P2001-288256A)

(4) 中、R3は、水素原子(H)、ハロゲン原子、-CN、-NO<sub>2</sub>、-CF<sub>3</sub>、-C<sub>2</sub>F<sub>5</sub>、-C<sub>6</sub>F<sub>7</sub>から選択される基であり、sは、1~8の整数から選択される；但し、上記一般式(1)におけるRとして、一種の基を選択する際には、式(2)において、R1=Hでq=2の基、R1=Hでq=3の基、式(3)において、R2=ハロゲン原子でr=2の基、R2=-CNでr=3の基、R2=-NO<sub>2</sub>でr=3の基、は、選択肢からは除外され、二種の基を選択する際には、式(2)において、R1=Hでq=3及び5の二種の基の組み合わせ、式(3)において、R2=Hでr=1及び3の二種の基の組み合わせ、R2=Hでr=2及び4の二種の基の組み合わせ、R2=Hでr=2及び6の二種の基の組み合わせ、R2=ハロゲン原子でr=2及び4の二種の基の組み合わせ、は、選択肢からは除外され、三種の基を選択する際には、式(2)において、R1=Hでq=3、5及び7の三種の基の組み合わせ、式(3)において、R2=Hでr=1、3及び5の三種の基の組み合わせ、R2=Hでr=2、4及び6の三種の基の組み合わせ、は、選択肢からは除外される。

まお、前記のように本発明のポリヒドロキシアルカノエートは、一般式(1)で表されるモノマーユニットを一種類含むものの他、複数種を含むことができるが、目的とするポリマーにおいて必要とする機能、物性などを考慮した上、適当な種類数のモノマーユニットを選択すると良い。一般には、式(1)で表されるモノマーユニットを合計10種類程度含むように選択することで、前記の目的を十分に達成することが期待できる。さらに、機能性、物性を微妙に制御することを目的として、10種類を超える多くの種類のモノマーユニットを含む構成とすることも可能である。

【0158】例えば、かかる一般式(1)で表されるモノマーユニットを複数種を含むポリヒドロキシアルカノエートを微生物に生産させる際には、原料のアルカノエートに対応するモノマーユニットの他、場合によっては、付随する炭素鎖の減少した副生モノマーユニットをも含むものとなる。従って、原料のアルカノエート自体は5種類程度であっても、それぞれ、副生物のモノマーユニットを含め二種以上のモノマーユニットを与える結果、合計して10種類以上のモノマーユニットを含むPHAとなるものも、本発明に包含される。さらには、例えば、上記の一般式(2)、一般式(3)ならびに一般式(4)の三種をいずれをも含み、それぞれ3種類程度までを選択し、合計して、10種類程度の原料アルカノエートの種類となり、若干の副生物モノマーユニットを含めて、10種類以上のモノマーユニットを含むPHAとなるものも、本発明に包含される。

【0159】また、一般式(2)におけるベンゼン環上の置換基R1、ならびに一般式(3)におけるベンゼン環上の置換基R2は、オルト位(2位または6位)、メ

タ位(3位または5位)ならびにパラ位(4位)のいずれを選択することも可能である。得られるポリヒドロキシアルカノエートは、対応する置換ベンゼン環を有するモノマーユニットを含むものとなる。何れの異性体を原料に選択するかは、目的とする機能性、物性に依りて、適宜選択されるものである。なお、前記の機能性、物性における相違が問題とならない場合、ベンゼン環上パラ位(4位)に置換基を有するものが、通常、収率あるいはポリマー中への取り込まれ易さの点において、無置換のものと同色なく、より好適に用いることができる。同じく、一般式(4)のシクロヘキシル環上、R3の置換位置は、1位、2位(または6位)、3位(または5位)ならびに4位のいずれを選択することも可能であり、加えて、cis配置とtrans配置のどちらをも選択可能である。得られるポリヒドロキシアルカノエートは、対応する置換シクロヘキシル環を有するモノマーユニットを含むものとなる。何れの異性体を選択するかは、目的とする機能性、物性に依りて、適宜選択されるものである。なお、前記の機能性、物性における相違が問題とならない場合、シクロヘキシル環上4位に置換基を有するものが、通常、収率あるいはポリマー中への取り込まれ易さの点において、無置換のものと同色なく、より好適である。なお、かかる微生物により生産されるポリヒドロキシアルカノエートは、そのモノマーユニットの3位の炭素原子は、キラル中心となるが、一般に、R-体のみから構成されるポリマーであり、従って、アイソクチックなポリマーである。その結果、かかる微生物を利用する方法で生産できるPHAは、生分解性を有するポリマーとなる。

#### 【0160】

【発明の実施の形態】本発明のPHAの製造方法は、微生物を培養する際、培地に原料の式(12)のアルカノエートに加えて、酵母エキスを添加することで、微生物が産生・蓄積するPHAにおいて、目的とするモノマーユニットの含有率を著しく高いものとする、あるいは目的とするモノマーユニットのみとする点を特徴としている。この特定のモノマーユニットの優先化を促進する効果は、培地中にPHAの原料となるアルカノエート以外の炭素源として、酵母エキスのみを添加することにより得られている。

【0161】微生物によるPHAの製造に際して、培地に酵母エキスを利用する例として、特開平5-49487号公報に記載の、ロドバクター属(Rhodobacter sp.)に属する微生物を用いた方法が挙げられる。しかしながら、この従来方法は、置換基を有しないヒドロキシアルカン酸をモノマーユニットとする、一般的なPHB及びPHVを生産する方法である。本発明の目的とするようなPHAの生合成経路は、PHB及びPHVを生産する生合成経路とは独立した経路であることが知られており、特開平5-49487号公報において

(24) 01-288256 (P2001-288256A)

は本発明の目的とするようなPHAの合成経路における酵母エキスの効果については何ら言及がない。また、酵母エキスの効果も、微生物が一般的に生産するPHB及びPHVに関して、酵母エキスを添加すると、単に菌体内のPHA蓄積量の増大が図られる効果があることを示すのみであり、増殖のために酵母エキスが添加されているわけではないことが明記されている。本発明は式(12)のアルカノエートと酵母エキスを共存させることで増殖とともにPHAの産生・蓄積を行うものであり、酵母エキスの発揮する効果が全く異なる。さらに本発明の効果である、特定のモノマーユニットの優占化について何ら言及されておらず、本発明のように、微生物が生産するPHA組成における、フェノキシ基、フェニル基及びシクロヘキシル基を置換基として有する特定のモノマーユニットの優占化という効果は示していない。

【0162】さらに、微生物によるPHAの生産に酵母エキスを利用する例としては、前述の特許第2989175号公報に記載のシュードモナス・アチダを用いた方法が挙げられる。ここで開示されているPHAの製造方法は2段階培養によるものであり、PHAの蓄積は2段階目の培養においてのみ、炭素源以外の栄養源の制限下で行うことが開示されている。この点で、本発明における、式(12)のアルカノエートと酵母エキスを含む培地での1段階目の培養のみで、所望のPHAの合成・蓄積を行う方法とは構成/効果ともに全く異なる。また、特許第2989175号における酵母エキスの効果は、2段階培養を用いる際、1段階目の培養において、単に2段階目の培養に用いる微生物の増殖のみを目的としたものであり、1段階目は栄養源の豊富な条件下で培養されたと明記されている。ここで、PHAの基質は1段階目には共存していない。本発明における2段階培養での酵母エキスの効果は、1段階目の培養において式(12)のアルカノエートと酵母エキスを共存させることで増殖とともにPHAの産生・蓄積を行うものであり、1段階目の培養における酵母エキスの発揮する効果が全く異なる。また、特許第2989175号では1段階目の培養に炭素源としてクエン酸、オクタン酸、ノナン酸のいずれかが共存しており、式(12)のアルカノエートと酵母エキスのみを共存させる本発明とは、構成においても異なるものである。

【0163】また、本発明中の3HPxBをモノマーユニットとして含むPHAを生産し、菌体内に蓄積する微生物の報告例として、Macromolecules, 29, 3432-3435, 1996に記載の、シュードモナス・オレオボランスを用いた方法がある。しかしながら、このシュードモナス・オレオボランスを用いる方法は、8-フェノキシオクタン酸(PxOA)のみを基質として用いるものであり、本発明の、例えば、β酸化によりアセチルCoAを生成し得ない、PxBAを基質として酵母エキスを共に用いる方法とは全く異なっ

ている点で、本質的な差異を持つものである。さらに、合成されるPHAは、基質であるPxOA由来の3-ヒドロキシ-8-フェノキシオクタン酸と、代謝産物由来の副生物である3-ヒドロキシ-6-フェノキシヘキサノ酸及び3HPxBの3種類のモノマーユニットからなる共重合体が生産される。それに対して、本発明の方法では、酵母エキスをを用いることでPxBA由来の3HPxBのみをフェノキシ基含有モノマーユニットとして含むPHAの製造についても可能となっており、この製造されるPHA自体も、前述の報告例と本発明とは、明確に異なっている。また、PxBAを基質とした、3HPxBをモノマーユニットとして含むPHAの微生物生産の報告例はなく、また、3HPxBのみをフェノキシ基含有モノマーユニットとして含むPHAの微生物生産に関する報告例もない。

【0164】以下に、本発明の製造方法をより詳しく説明する。

【0165】本発明に用いる微生物としては、式(12)のアルカノエートを基質とし、当該アルカノエートからPHAを生産・蓄積しうる微生物であればいかなる微生物でもよいが、本発明者らの研究によると、シュードモナス属の細菌が良く、その中でもシュードモナス・チコリアイ・YN2株(Pseudomonas cichorii YN2, FERM P-17411)、シュードモナス・チコリアイ・H45株(Pseudomonas cichorii H45, FERM P-17410)、シュードモナス・アチダ・P91株(Pseudomonas putida P91, FERM P-17409)及びシュードモナス・ジェッセニイ・P161株(Pseudomonas jeseni P161, FERM P-17445)が好ましい微生物であることを見出した。なお、これらの菌株以外のものでも、当該アルカノエートを基質とした培養によって、例えばPseudomonas属に属する細菌のスクリーニングを行うことで、本発明のPHAの製造方法に利用し得る微生物を得ることも可能である。例えばシュードモナス属の細菌としては、シュードモナス・オレオボランスを利用することが可能である。また、シュードモナス属に属する微生物に加えて、アエロモナス(Aeromonas sp.)属、コマモナス(Comamonas sp.)属、バークホルデリア(Burkholderia sp.)属などに属し、当該アルカノエートを原料(基質)として用いて、対応する3-ヒドロキシアリカノエートをモノマーユニットとして含むPHAを生産する微生物を用いることも可能である。しかしながら、生産能力などの点を考慮すると、上記の4種の菌株を好ましい菌株として挙げるができる。

【0166】以下にYN2株、H45株、P91株及びP161株についての詳細を示す。

(25) 101-288256 (P2001-288256A)

## &lt;YN2株の菌学的性質&gt;

培養温度	: 30°C
形態学的性質	
細胞形態	: 桿菌、 $0.8\mu\text{m} \times (1.5 \sim 2.0)\mu\text{m}$
グラム染色	: 陰性
胞子形成	: 陰性
運動性	: 陽性
コロニー形状	: 円形、全縁なめらか、低凸状、表面なめらか、光沢、半透明
生理学的性質	
カタラーゼ	: 陽性
オキシダーゼ	: 陽性
O/F試験	: 非発酵性
硝酸還元	: 陰性
インドール産生	: 陽性
ブドウ糖酸性化	: 陰性
アルギニンジヒドロラーゼ	: 陰性
ウレアーゼ	: 陰性
エスクリン加水分解	: 陰性
ゼラチン加水分解	: 陰性
$\beta$ -ガラクトシダーゼ	: 陰性
基質資化能	

ブドウ糖	: 陽性
L-アラビノース	: 陽性
D-マンノース	: 陰性
D-マンニトール	: 陰性
N-アセチル-D-グルコサミン	: 陰性
マルトース	: 陰性
グルコン酸カリウム	: 陽性
n-カプリン酸	: 陽性
アジピン酸	: 陰性
d1-リンゴ酸	: 陽性
クエン酸ナトリウム	: 陽性
酢酸フェニル	: 陽性
King'sB寒天での蛍光色産生	: 陽性
4%NaClでの生育	: 陽性(弱)
ポリ- $\beta$ -ヒドロキシ酪酸の蓄積	: 陰性(*)
Tween80の加水分解	: 陽性

\* nutrient agar培養コロニーをズダンブラックで染色することで判定。

## &lt;H45株の菌学的性質&gt;

形態学的性質	
細胞の形と大きさ	: 桿菌、 $0.8\mu\text{m} \times (1.0 \sim 1.2)\mu\text{m}$
細胞の多形性	: なし
運動性	: あり
胞子形成	: なし
グラム染色性	: 陰性
コロニー形状	: 円形、全縁なめらか、低凸状、表面なめらか、光沢、クリーム色
生理学的性質	
カタラーゼ	: 陽性



(26) 01-288256 (P2001-288256A)

オキシダーゼ : 陽性  
 O/F試験 : 酸化型  
 硝酸塩の還元 : 陰性  
 インドールの生成 : 陰性  
 ブドウ糖酸性化 : 陰性  
 アルギニンジヒドロラーゼ : 陰性  
 ウレアーゼ : 陰性  
 エスクリン加水分解 : 陰性  
 ゼラチン加水分解 : 陰性  
 $\beta$ -ガラクトシダーゼ : 陰性  
 King'sB寒天での蛍光色素産生 : 陽性  
 4% NaClでの生育 : 陰性  
 ホリー $\beta$ -ヒドロキシ酪酸の蓄積 : 陰性  
 基質資化能  
 ブドウ糖 : 陽性  
 L-アラビノース : 陰性  
 D-マンノース : 陽性  
 D-マンニトール : 陽性  
 N-アセチル-D-グルコサミン : 陽性  
 マルトース : 陰性  
 グルコン酸カリウム : 陽性  
 n-カプリン酸 : 陽性  
 アジピン酸 : 陰性  
 d-リネン酸 : 陽性  
 クエン酸ナトリウム : 陽性  
 酢酸フェニル : 陽性  
 <P91株の菌学的性質>  
 形態学的性質  
 細胞の形と大きさ : 桿菌、 $0.6\mu\text{m} \times 1.5\mu\text{m}$   
 細胞の多形性 : なし  
 運動性 : あり  
 胞子形成 : なし  
 グラム染色性 : 陰性  
 コロニー形状 : 円形、金緑なめらか、低凸状、表面なめらか、光沢  
 、クリーム色  
 生理学的性質  
 カタラーゼ : 陽性  
 オキシダーゼ : 陽性  
 O/F試験 : 酸化型  
 硝酸塩の還元 : 陰性  
 インドールの生成 : 陰性  
 ブドウ糖酸性化 : 陰性  
 アルギニンジヒドロラーゼ : 陽性  
 ウレアーゼ : 陰性  
 エスクリン加水分解 : 陰性  
 ゼラチン加水分解 : 陰性  
 $\beta$ -ガラクトシダーゼ : 陰性  
 King'sB寒天での蛍光色素産生 : 陽性  
 基質資化能  
 ブドウ糖 : 陽性

(27) 01-288256 (P2001-288256A)

L-アラビノース : 陰性  
 D-マンノース : 陰性  
 D-マンニトール : 陰性  
 N-アセチル-D-グルコサミン : 陰性  
 マルトース : 陰性  
 グルコン酸カリウム : 陽性  
 n-カプリン酸 : 陽性  
 アジピン酸 : 陰性  
 dl-リンゴ酸 : 陽性  
 クエン酸ナトリウム : 陽性  
 酢酸フェニル : 陽性

## &lt;P161株の菌学的性質&gt;

## 形態学的性質

細胞の形と大きさ : 球状、 $\phi 0.6 \mu\text{m}$  / 桿状、 $0.6 \mu\text{m} \times 1.5 \sim 2.0 \mu\text{m}$

細胞の多形性 : あり (伸長型)

運動性 : あり

孢子形成 : なし

グラム染色性 : 陰性

コロニー形状 : 円形、全縁なめらか、低凸状、表面なめらか、淡黄色

## 生理学的性質

カタラーゼ : 陽性  
 オキシダーゼ : 陽性  
 O/F試験 : 酸化型  
 硝酸塩の還元 : 陽性  
 インドールの生成 : 陰性  
 ブドウ糖酸性化 : 陰性  
 アルギニンジヒドロラーゼ : 陽性  
 ウレアーゼ : 陰性  
 エスクリン加水分解 : 陰性  
 ゼラチン加水分解 : 陰性  
 $\beta$ -ガラクトシダーゼ : 陰性  
 King'sB寒天での蛍光色素産生 : 陽性

## 基質資化能

ブドウ糖 : 陽性  
 L-アラビノース : 陽性  
 D-マンノース : 陽性  
 D-マンニトール : 陽性  
 N-アセチル-D-グルコサミン : 陽性  
 マルトース : 陰性  
 グルコン酸カリウム : 陽性  
 n-カプリン酸 : 陽性  
 アジピン酸 : 陰性  
 dl-リンゴ酸 : 陽性  
 クエン酸ナトリウム : 陽性  
 酢酸フェニル : 陽性

【0167】以上の菌学的性質から、バージェーズ・マ  
 ニュアル・オブ・システムティック・バクテリオロジー  
 ・第1巻 (Bergey's Manual of Sys  
 tematic Bacteriology, Volu

me1) (1984年) 及びバージェーズ・マニユアル  
 ・オブ・ディタミネーティブ・バクテリオロジー (Be  
 rgey's Manual of Determina  
 tive Bacteriology) 第9版 (199

(28) 01-288256 (P2001-288256A)

4年)に基づいて検索したところ、YN2株及びH45株は、シュードモナス・チコリアイ (*Pseudomonas cichorii*) に、また、P91株は、シュードモナス・プチダ (*Pseudomonas putida*) に、それぞれ属すると判明した。従って、これらの菌株をシュードモナス・チコリアイ・YN2株、シュードモナス・チコリアイ・H45株、シュードモナス・プチダ・P91株とそれぞれ命名した。

【0168】一方、P161株は、シュードモナス属 (*Pseudomonas* sp.) に属すると判明したものの、その菌学的性質から分類学上の位置を確定するには至らなかった。そこで、遺伝的性質からの分類を試みるために、図12に示すP161株の16S rRNAの塩基配列を決定し (配列番号: 1, cDNA to rRNA)、公知のシュードモナス属微生物の16S rRNAの塩基配列との相同性を調べた。その結果、P161株とシュードモナス・ジェッセニ (*Pseudomonas jessenii*) との間で、塩基配列の相同性が極めて高いことが判明した。さらに、System. Appl. Microbiol., 20, 137-149 (1997)、及び、System. Appl. Microbiol., 22, 45-58 (1999) に記載されたシュードモナス・ジェッセニの菌学的性質と、P161株の菌学的性質との間で高い類似性も認められた。以上の結果から、P161株はシュードモナス・ジェッセニに属せしめるのが妥当と判断されたため、P161株をシュードモナス・ジェッセニ・P161株と命名した。

【0169】なお、YN2株は寄託番号「FERM P-17411」として、H45株は寄託番号「FERM P-17410」として、P91株は寄託番号「FERM P-17409」として、P161株は寄託番号「FERM P-17445」として、通商産業省 工業技術院 生命工学工業技術研究所 (生命研NIBH特許微生物寄託センター) にそれぞれ寄託されている。

【0170】これらの微生物を、所望とするモノマーユニット導入用の原料、一般式(12)のアルカノエートと酵母エキスを含有培地で培養することで、目的とするPHAを製造することができる。

【0171】本発明のPHAの製造方法に用いる微生物の通常の培養、例えば、保存菌株の作成、菌数や活性状態の確保のための培養などには、微生物の生育や生存に悪影響を及ぼすものでない限り、一般的な天然培地や栄養源を添加した合成培地等、いかなる種類の培地をも用いることができる。温度、通気、攪拌などの培養条件は用いる微生物に応じて適宜選択する。

【0172】一方、微生物を用いてPHAを生産・蓄積させる場合は、PHA生産用の培地として、対応する一般式(12)のアルカノエートを少なくとも含んだ無機培地を用いることができる。その際、PHAの原料とな

るアルカノエート以外の炭素源/エネルギー源としては、酵母エキスのみを添加することが特徴である。

【0173】上記の培養方法に用いる無機培地としては、リン源 (例えば、リン酸塩等)、窒素源 (例えば、アンモニウム塩、硝酸塩等) 等、微生物の増殖に必要な成分を含んでいるものであればいかなるものでも良く、例えば、代表的な無機培地としては、MSB培地、E培地 (J. Biol. Chem., 218, 97-106 (1956))、M9培地等を挙げることができる。

【0174】なお、本発明における実施例で用いるM9培地の組成は以下の通りである。

【0175】 $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ : 6.2 g

$\text{KH}_2\text{PO}_4$ : 3.0 g

$\text{NaCl}$ : 0.5 g

$\text{NH}_4\text{Cl}$ : 1.0 g

(培地1リットル中、pH7.0)

培養条件としては、例えば、15~40℃、好ましくは20~35℃で、好気条件下での振盪培養や攪拌培養が挙げられる。

【0176】培養工程は、バッチ式、流動バッチ式、半連続培養、連続培養、リアクター形式など、通常の微生物の培養に用いるいかなる方法をも用いることができ、これらの工程を複数段階接続した多段方式を採用してもよい。

【0177】例えば、二段階の培養工程を含む方法としては、一段階目では、増殖用炭素源として酵母エキスを0.1重量%から1.0重量%程度、及び、式(12)のアルカノエートを0.01重量%から0.5重量%程度含んだ無機培地等で対数増殖後期から定常期に達する時点まで培養し、二段階目では、一段階目での培養終了後の菌体を遠心分離等で回収したのち、原料の式(12)のアルカノエートを0.01重量%から0.5重量%程度含んだ、炭素源が存在しない無機培地で更に培養し、培養終了後、菌体を回収して所望のPHAを抽出する方法がある。

【0178】また、酵母エキスを0.1重量%から1.0重量%程度、及び、式(12)のアルカノエートを0.01重量%から0.5重量%程度を加えた無機培地で培養し、対数増殖後期から定常期に達した時点で菌体を回収して所望のPHAを抽出する方法もある。

【0179】その際、培地に添加する酵母エキス濃度は、式(12)のアルカノエートの種類、微生物の属種、菌体密度、あるいは培養方法に応じて適宜選択するものであるが、通常、培地中の含有率を、0.1重量%から1.0重量%程度に選択して、添加するとよい。また、酵母エキスは、微生物の培養などに汎用される市販の酵母エキス何れについても、好適に用いることが可能である。また、酵母エキスを代えて、酵母エキスの成分を当然に含んでいる、酵母の凍結乾燥物を粉碎したもの

(329) 01-288256 (P2001-288256A)

などを用いることも可能である。一方、原料となる式(12)のアルカノエートの濃度も、微生物の属種、菌体密度、あるいは培養方法に応じて適宜選択するものであるが、通常、培地中の含有率を0.01重量%から0.5重量%程度に選択して、添加するとよい。

【0180】なお、先に記載したYN2株、H45株、P91株及びP161株のいずれかを用いる場合において、酵母エキスに代えて、例えば、C6~C12の中鎖脂肪酸(例えばオクタン酸やノナン酸等)を増殖用炭素源として用いた場合、添加されている中鎖の脂肪酸に由来するモノマーユニットが混在したPHAが取得されてくる。具体的には、増殖用炭素源として、オクタン酸やノナン酸等の中鎖の脂肪酸を加え、原料として式(12)のアルカノエートを添加した無機培地等で、対数増殖後期から定常期の時点まで培養し、菌体を遠心分離等で回収したのち、中鎖の脂肪酸と式(12)のアルカノエートとを添加し、窒素源が存在しない無機培地で更に培養する方法を用いた場合が挙げられる。あるいは、無機培地中の窒素源濃度を1/10程度に制限し、中鎖の脂肪酸と式(12)のアルカノエートとを加えた培地で培養し、対数増殖後期から定常期の時点で菌体を回収して、所望のPHAを抽出する方法を用いた場合が挙げられる。これら増殖用炭素源として、中鎖の脂肪酸を培地に添加する方法を用いる場合には、取得されるPHAは、増殖用炭素源として添加されている、中鎖の脂肪酸に由来するモノマーユニットが混在しているPHAとなっている。

【0181】これに対して、本発明では、先に述べた通り、酵母エキスと式(12)のアルカノエートとを含み、その他に炭素源を含まない培地で上記微生物を培養することによって、目的とする式(12)のアルカノエートに由来するモノマーユニット以外の、不要なモノマーユニットの混在が少なく、あるいは全くない、所望のPHAが生産・蓄積される。

【0182】本発明の方法における菌体からのPHAの回収は、通常行われているクロロホルム等の有機溶媒による抽出が最も簡便ではあるが、有機溶媒が使用しにくい環境中においては、SDS等の界面活性剤による処理、リゾチーム等の酵素による処理、EDTA、次亜塩素酸ナトリウム、アンモニア等の薬剤による処理によってPHA以外の菌体成分を除去して、PHAを回収する方法を用いることもできる。

【0183】なお、微生物の培養、微生物によるPHAの生産と菌体内への蓄積、並びに、菌体からのPHAの回収は、上記の方法に限定されるものではない、例えば、本発明にかかるPHAの製造方法に利用される微生物は上記の4種の菌株以外でも、これら4種の菌株と同様の本発明にかかるPHA生産の生産能を有する微生物を用いることができる。

【0184】上記の方法を利用することで、先に式

(1)で示す繰返し単位を有するPHAを得ることができ、このPHAの数平均分子量は少なくとも1万以上であることが望ましく、1万~20万の範囲であることが好ましい。すなわち、このPHAにおいて、ポリマーとして所望の特性を安定に得る上では、具体的には、ポリマーを構成するモノマーユニットの構造により規定されるガラス転移温度、軟化点、融点、結晶性、配向性などの特性を一定の範囲とする上では、少なくとも数平均分子量が1万程度となる繰返し数を有することが望ましい。一方、加工等において、溶解操作などの処理の簡便性から、数平均分子量が20万程度までであることが好ましい。通常、1万~10万の範囲とすると、より好ましい。また、本発明の製造方法で得られるPHAの数平均分子量は、1万以上、おおよそ2万以上であり、前記のポリマーとしての安定した物性の発現を十分に期待できる範囲内にある。

【0185】

【実施例】以下に、具体例を示し、本発明をより詳しく説明する。これらの具体例は、本発明における最良の態様の一例であるが、本発明は以下の具体例によってなんら限定されるものではない。

A: 本発明のポリヒドロキシアルカノエートの製造方法を、式(14)の4-フェノキシ酪酸(PxBA)を原料とする、式(5)で表される3-ヒドロキシ-4-フェノキシ酪酸(HPxBA)に由来するモノマーユニットからなるポリヒドロキシアルカノエート: ポリ-3-ヒドロキシ-4-フェノキシ酪酸(PHPxB)の製造に適用した一例を示す。

【0186】(実施例A-1) 酵母エキス0.5%、PxBA0.1%を含むM9培地200mlにP91株を接種し、30℃、125ストローク/分で振盪培養した。24時間後、菌体を遠心分離によって回収し、PxBA0.1%を含む、窒素源(NH<sub>4</sub>Cl)を含まないM9培地200mlに再懸濁して、更に30℃、125ストローク/分で振盪培養した。24時間後、菌体を遠心分離によって回収し、冷メタノールで一度洗浄して凍結乾燥した。

【0187】この凍結乾燥ペレットを100mlのクロロホルムに懸濁し、60℃で20時間攪拌してPHAを抽出した。抽出液を孔径0.45μmのメンブレンフィルターでろ過したのち、ロータリーエバポレーターで濃縮し、濃縮液を冷メタノール中で再沈殿させ、更に沈殿のみを回収して真空乾燥してPHAを得た。得られたPHAは、常法に従ってメタノリシスを行ったのち、ガスクロマトグラフィー-質量分析装置(GC-MS、島津QP-5050、EI法)で分析し、PHAモノマーユニットのメチルエステル化物の同定を行った。また、このPHAの分子量を、ゲルパーミエーションクロマトグラフィー(GPC; 東ソー・HLC-8020、カラム: ポリマーラボラトリー・PLgel MIXED-

(B0) 101-288256 (P2001-288256A)

C・5 $\mu$ m、溶媒：クロロホルム、ポリスチレン換算分子量)により測定した。

【0188】表3に同定結果と平均分子量を示す。得られたPHAは、そのモノマーユニットとして、式(5)で表される3-ヒドロキシ-4-フェノキシ酪酸に由来

するモノマーユニットのみを含み、ポリ-3-ヒドロキシ-4-フェノキシ酪酸であることが判る。

【0189】

【表3】

P. putida P91株

菌体乾燥重量	520 mg/L
ポリマー乾燥重量	14 mg/L
ポリマー乾燥重量/菌体乾燥重量	2.7%
ポリマー分子量	Mn=42,000 Mw=84,000
モノマーユニット組成 (エリア比)	
3-ヒドロキシ酪酸	0%
3-ヒドロキシ吉草酸	0%
3-ヒドロキシヘキサノ酸	0%
3-ヒドロキシヘプタン酸	0%
3-ヒドロキシオクタン酸	0%
3-ヒドロキシノナン酸	0%
3-ヒドロキシデカン酸	0%
3-ヒドロキシ-4-フェノキシ酪酸	100%

【0190】(実施例A-2)酵母エキス0.5%、PxB A0.2%とを含むM9培地200mlにP91株を接種し、30℃、125ストローク/分で振盪培養した。48時間後、菌体を遠心分離によって回収し、冷メタノールで一度洗浄して凍結乾燥した。

【0191】この凍結乾燥ペレットを100mlのクロロホルムに懸濁し、60℃で20時間攪拌してPHAを抽出した。抽出液を孔径0.45 $\mu$ mのメンブレンフィルターでろ過したのち、ロータリーエバポレーターで濃縮し、濃縮液を冷メタノール中で再沈殿させ、更に沈殿のみを回収して真空乾燥してPHAを得た。得られたP

HAは、常法に従ってメタノリシスを行ったのち、ガスクロマトグラフィー質量分析装置(GC-MS, 島津QP-5050, EI法)で分析し、PHAモノマーユニットのメチルエステル化物の同定を行った。表4に同定結果を示す。得られたPHAは、そのモノマーユニットとして、式(5)で表される3-ヒドロキシ-4-フェノキシ酪酸に由来するモノマーユニットのみを含み、ポリ-3-ヒドロキシ-4-フェノキシ酪酸であることが判る。

【0192】

【表4】

(S1) 01-288256 (P2001-288256A)

## P. putida P91株

菌体乾燥重量	590 mg/L
ポリマー乾燥重量	8 mg/L
ポリマー乾燥重量/菌体乾燥重量	1.4%
モノマーユニット組成 (エリア比)	
3-ヒドロキシ酪酸	0%
3-ヒドロキシ吉草酸	0%
3-ヒドロキシヘキサン酸	0%
3-ヒドロキシヘプタン酸	0%
3-ヒドロキシオクタン酸	0%
3-ヒドロキシノナン酸	0%
3-ヒドロキシデカン酸	0%
3-ヒドロキシ-4-フェノキシ酪酸	100%

【0193】(実施例A-3) P91株の培養菌体から回収したPHAについて、核磁気共鳴装置 (FT-NMR: Bruker DPX400) を用いて、以下の条件で分析した。

【0194】測定核種:  $^1\text{H}$ 、使用溶媒: 重クロロホルム (TMS入り)。

【0195】その測定結果を図1に、また、表5に各信号の解析結果 (帰属) を示す。表5には、下記する3-

$^1\text{H}$ -NMRスペクトル測定結果

ヒドロキシ-4-フェノキシ酪酸この結果から、PHAは、式(5)で表される3-ヒドロキシ-4-フェノキシ酪酸に由来するモノマーユニットのみを含み、ポリ-3-ヒドロキシ-4-フェノキシ酪酸であることが確認される。

【0196】

【表5】

共鳴周波数: 400MHz

$\delta$ 値 (ppm)	帰属
0.8~1.6	不純物
2.71	d: 2H, a
3.97	d: 2H, c
5.47	m: 1H, b
6.79	d: 2H, f, h
6.90	t: 1H, g
7.19	t: 2H, e, i

m: multiplet, t: triplet, d: doublet

【0197】B: 本発明のポリヒドロキシアルカノエートの製造方法を、式(15)の5-フェノキシ吉草酸 (PxVA) を原料とする、式(6)で表される3-ヒドロキシ-5-フェノキシ吉草酸 (HPxVA) に由来するモノマーユニットからなるポリヒドロキシアルカノエート: ポリ-3-ヒドロキシ-5-フェノキシ吉草酸 (PHPxV) の製造に適用した一例を示す。

【0198】(実施例B-1) PxVAの合成  
三つ口丸底フラスコに、240mlの脱水アセトンを入れ、ヨウ化ナトリウム (0.06モル)、炭酸カリウム (0.11モル) 及びフェノール (0.07モル) を加え、十分に撹拌した。この溶液中に、5-ブロモ吉草酸エチルエステル (0.06モル) を、窒素雰囲気下で滴下し、60±5℃で還流し、24時間反応させた。反応

終了後、反応液をエバポレーターで濃縮乾固させ、塩化メチレンに再溶解し、溶液に水を加えて分液し、有機層を無水硫酸マグネシウムで脱水した後エバポレーターで濃縮乾固した。得られた乾燥物 (反応物) に熱メタノールを加えて溶解させ、ゆっくり冷却して再沈殿させ、5-フェノキシ吉草酸エチルエステル (PxVA) を得た。この時点での、このエステルの5-ブロモ吉草酸エチルエステルに対する収率は、72モル%であった。

【0199】得られた反応物 (エステル) を5重量%になるようにエタノール-水 (9:1 (v/v)) に溶解し、10倍モル量の水酸化カリウムを加えて、0~4℃で4時間反応させ、エステルの加水分解を行った。この反応液を10倍量の0.1M塩酸水溶液に注加し、沈殿物をろ過により回収した。回収した沈殿物 (反応物) は

(S2) 101-288256 (P2001-288256A)

室温で36時間減圧乾燥した。得られた乾燥物を少量の熱エタノールに溶解させ、溶液を徐々に冷却して再沈殿させて室温で24時間減圧乾燥し、目的の化合物である5-フェノキシ吉草酸を得た。この目的化合物の5-ブロモ吉草酸エチルエステルに対する収率は、53モル%であった。

【0200】得られた化合物の核磁気共鳴装置(NMR)による分析を以下の条件で行った。

<使用機器>

FT-NMR: Bruker DPX400

<sup>1</sup>H共鳴周波数: 400MHz

<測定条件>

測定核種: <sup>1</sup>H

使用溶媒: CCl<sub>3</sub>

reference: キャピラリー封入TMS/CCl<sub>3</sub>

測定温度: 室温

図2にスペクトルのチャートを、表6に同定結果を示す。

【0201】

【表6】

<sup>1</sup>H-NMRスペクトル測定結果

共鳴周波数: 400MHz

Chemical Shift / ppm	積分値 / H	type	同定結果
1.562		broad	不純物
1.863	4	m	c, d
2.474	2	t	b
3.984	2	t	e
6.905	2	t	h, j
6.984	1	t	i
7.28	2	t	k, l
9.35		broad	-COOH

m: multiplet

t: triplet

d: doublet

【0202】この結果から、確かに所望のPxVAが含まれている事が確認された。

【0203】(実施例B-2) P91株によるPHPxVホモポリマーの製造

酵母エキス(DIFCO製)0.5重量%、PxVA0.1重量%を含むM9培地200mlにP91株を植菌し、30℃、125ストローク/分で振盪培養した。24時間後、菌体を遠心分離によって回収し、PxVA0.1%を含む、窒素源(NH<sub>4</sub>Cl)を含まないM9培地200mlに再懸濁して、更に30℃、125ストローク/分で振盪培養した。24時間後、菌体を

遠心分離によって回収し、冷メタノールで一度洗浄して凍結乾燥し、秤量した。

【0204】この凍結乾燥ペレットを100mlのクロロホルムに懸濁し、60℃で20時間攪拌してPHAを抽出した。抽出液を孔径0.45μmのメンブレンフィルターでろ過した後、ロータリーエバポレーターで濃縮し、濃縮液を冷メタノール中で再沈殿させ、更に沈殿のみを回収して真空乾燥してPHAを得、これを秤量した。菌体及びポリマーの収率を表7に示す。

【0205】

【表7】

乾燥菌体 (mg/l)	乾燥ポリマー (mg/l)	収率 (乾燥ポリマー/乾燥菌体, %)
750	45	6.0

【0206】得られたPHAの組成は以下のようにして分析した。即ち、PHAサンプル5mgを25ml容量型フラスコに入れ、クロロホルム2ml及び硫酸を3%(v/v)含むメタノール2mlを加えて100℃で3.5時間還流し、水を加えて分液した後、有機相をガスクロマトグラフィー-質量分析装置(GC-MS, 島津QP-5050、カラム: DB-WAXETR (J&W社製)、EI法)で分析し、PHAモノマーユニットのメチルエステル化合物の同定を行った。その結果、メインのピークは一本であり、そのマススペクトルから3-ヒドロキシ-5-フェノキシ吉草酸のメチルエステル化合物であることがわかった。また、その他の微量

成分はPHAのモノマーユニットとは無関係のものであった。GC-MSのトータルイオンクロマトグラフィー(TIC)及びメインピークのマススペクトルを図3に示す。

【0207】また、得られたポリマーを以下の条件でNMR分析を行った。

<使用機器>

FT-NMR: Bruker DPX400

<sup>1</sup>H共鳴周波数: 400MHz

<測定条件>

測定核種: <sup>1</sup>H

使用溶媒: CCl<sub>3</sub>

(3) 101-288256 (P2001-288256A)

reference: キヤピラリ封入TMS/CDCl<sub>3</sub>

測定温度: 室温

図4にスペクトルのチャート、表8に同定結果を示

<sup>1</sup>H-NMRスペクトル測定結果

す。

【0208】

【表8】

共鳴周波数: 400MHz

Chemical Shift / ppm	積分値 / I	type	同定結果
1.562		broad	不純物
2.009	2	m	d
2.585	2	d	b
3.9	2	m	c
5.365	1	m	c
6.81	2	m	h, j
6.89	1	t	i
7.21	2	t	k, k

m: multiplet

t: triplet

d: doublet

s: singlet

【0209】更に、得られたPHAの分子量をゲルパーミエーションクロマトグラフィー (GPC; 東ソー HLC-8020、カラム: ポリマーラボラトリー PL gel MIXED-C (5 $\mu$ m)、溶媒: クロロホルム、ポリスチレン換算) により評価した結果、Mn=70000、Mw=121000であった。

【0210】以上の結果より、本発明の方法により、PxVAを原料とする、ポリ-3-ヒドロキシ-5-フェノキシ吉草酸のホモポリマー、及びその製造方法が示された。

【0211】(実施例B-3) H45株によるPHPxVホモポリマーの製造  
酵母エキス(DIFCO製) 0.5重量%、PxVA

乾燥菌体 (mg/l)	乾燥ポリマー (mg/l)	収率 (乾燥ポリマー/乾燥菌体, %)
850	95	11.2

【0214】得られたPHAの組成は以下のようにして分析した。即ち、PHAサンプル5mgを25ml容ナス型フラスコに入れ、クロロホルム2ml及び硫酸を3% (v/v) 含むメタノール2mlを加えて100℃で3.5時間還流し、水を加えて分液した後、有機層をガスクロマトグラフィー質量分析装置 (GC-MS、島津QP-5050、カラム: DB-WAXETR (J&W社製) EI法) で分析し、PHAモノマーユニットのメチルエステル化物の同定を行った。その結果、メインのピークは一本であり、そのマススペクトルから3-ヒドロキシ-5-フェノキシ吉草酸のメチルエステル化物であることがわかった。また、その他の微量成分はPHAのモノマーユニットとは無関係のものであった。GC-MSのトータルイオンクロマトグラフィー (TIC) 及びメインピークのマススペクトルを図5に示す。

0.1重量%とを含むM9培地200mlにH45株を植菌し、30℃、125ストローク/分で振盪培養した。24時間後、菌体を遠心分離によって回収し、冷メタノールで一度洗浄して凍結乾燥し、秤量した。

【0212】この凍結乾燥ペレットを100mlのクロロホルムに懸濁し、60℃で20時間攪拌してPHAを抽出した。抽出液を孔径0.45 $\mu$ mのメンブレンフィルターでろ過した後、ロータリーエバポレーターで濃縮し、濃縮液を冷メタノール中で再沈殿させ、更に沈殿のみを回収して真空乾燥してPHAを得、これを秤量した。菌体及びポリマーの収率を表9に示す。

【0213】

【表9】

【0215】更に、得られたPHAの分子量をゲルパーミエーションクロマトグラフィー (GPC; 東ソー HLC-8020、カラム: ポリマーラボラトリー PL gel MIXED-C (5 $\mu$ m)、溶媒: クロロホルム、ポリスチレン換算) により評価した結果、Mn=64000、Mw=116000であった。

【0216】以上の結果より、本発明の方法により、PxVAを原料とする、ポリ-3-ヒドロキシ-5-フェノキシ吉草酸のホモポリマー、及びその製造方法が示された。

C: 本発明のポリヒドロキシアルカノエートの製造方法を、式(17)の5-(4-フルオロフェノキシ)吉草酸 (FPxVA) を原料とする、式(16)で表される3-ヒドロキシ-5-(4-フルオロフェノキシ)吉草酸 (HFPxVA) に由来するモノマーユニットからな



(B4) 01-288256 (P2001-288256A)

るポリヒドロキシアルカノエート：ポリ-3-ヒドロキシ-5-(4-フルオロフェノキシ) 吉草酸 (PHFPxV) の製造に適用した一例を示す。

【0217】(実施例C-1) FPxVAの合成  
三口丸底フラスコに、240mlの脱水アセトンを入れ、ヨウ化ナトリウム(0.06モル)、炭酸カリウム(0.11モル)及び4-フルオロフェノール(0.07モル)を加え、十分に攪拌した。この溶液中に、5-プロモ吉草酸エチルエステル(0.06モル)を、窒素雰囲気下で滴下し、60±5℃で還流し、24時間反応させた。反応終了後、反応液をエバポレーターで濃縮乾燥させ、塩化メチレンに再溶解し、水を加えて分液し、有機層を無水硫酸マグネシウムで脱水した後、エバポレーターで濃縮乾燥して反応物を得た。

【0218】得られた反応物に、熱メタノールを加えて溶解させ、溶液をゆっくり冷却して再沈殿させ、5-(4-フルオロフェノキシ) 吉草酸エチルエステルを得た。この時点での、5-プロモ吉草酸エチルエステルに対する収率は、68モル%であった。

【0219】得られた反応物(エステル)を5重量%になるようにエタノール-水(9:1(v/v))に溶解し、10倍モル量の水酸化カリウムを加えて、0~4℃で4時間反応させ、エステルの加水分解を行った。

<sup>1</sup>H-NMRスペクトル測定結果

【0220】この反応液を10倍量の0.1M塩酸水溶液に注加し、沈殿物をろ過により回収した。回収した沈殿物(反応物)は室温で36時間減圧乾燥した。得られた乾燥物を少量の熱エタノールに溶解させ、溶液を徐々に冷却して再沈殿させて室温で24時間減圧乾燥し、目的の化合物である、式(17)で表される5-(4-フルオロフェノキシ) 吉草酸を得た。この化合物の5-プロモ吉草酸エチルエステルに対する収率は、49モル%であった。

【0221】得られた化合物について、以下の条件でNMR分析を行った。

<使用機器>

FT-NMR: Bruker DPX400

<sup>1</sup>H共鳴周波数: 400MHz

<測定条件>

測定核種: <sup>1</sup>H

使用溶媒: CDCl<sub>3</sub>

reference: キャピラリー封入TMS/CDCl<sub>3</sub>

測定温度: 室温

図6に<sup>1</sup>H-NMRスペクトルチャートを、表10に同定結果を示す。

【0222】

【表10】

共鳴周波数: 400MHz

Chemical Shift / ppm	積分値 / H	type	同定結果
1.85	4	m	c, d
2.45	2	t	b
3.95	2	t	e
6.89	2	t	h, j
6.97	2	t	g, k
10.15		broad	-COOH

m: multiplet

t: triplet

d: doublet

【0223】以上の結果から、確かに所望のFPxVAが合成されている事が確認された。

【0224】(実施例C-2) P91株によるPHFPxVホモポリマーの製造

酵母エキス(DIFCO製)0.5重量%と、FPxVA 0.1重量%を含むM9培地200mlにP91株を接種し、30℃、125ストローク/分で振盪培養した。24時間後、菌体を遠心分離によって回収し、FPxVA 0.1重量%を含む、窒素源(NH<sub>4</sub>Cl)を含まないM9培地200mlに再懸濁して、更に30℃、125ストローク/分で振盪培養した。24時間

後、菌体を遠心分離によって回収し、冷メタノールで一度洗浄して凍結乾燥し、秤量した。

【0225】この凍結乾燥ペレットを100mlのクロロホルムに懸濁し、60℃で20時間攪拌してPHAを抽出した。抽出液を孔径0.45μmのメンブレンフィルターでろ過したのち、ロータリーエバポレーターで濃縮し、濃縮液を冷メタノール中で再沈殿させ、更に沈殿のみを回収して真空乾燥してPHAを得、これを秤量した。菌体及びポリマーの収率を表11に示す。

【0226】

【表11】

乾燥菌体 (mg/l)	乾燥ポリマー (mg/l)	収率 (乾燥ポリマー/乾燥菌体, %)
700	35	5.0

( 5 ) 101-288256 ( P2001-288256A )

【0227】得られたPHAの組成は以下のようにして分析した。即ち、PHAサンプル5mgを25ml容ナス型フラスコに入れ、クロロホルム2ml及び硫酸を3% (v/v) 含むメタノール2mlを加えて100℃で3.5時間還流し、更に水を加えて分液した後、有機層をガスクロマトグラフィー質量分析装置 (GC-MS、島津QP-5050、カラム: DB-WAXETR (J&W社製)、EI法) で分析し、PHAモノマーユニットのメチルエステル化物の同定を行った。その結果、メインのピークは一本であり、そのマススペクトルから3-ヒドロキシ-5-(4-フルオロフェノキシ)吉草酸のメチルエステル化物であることがわかった。また、その他の微量成分はPHAのモノマーユニットとは無関係のものであった。3-ヒドロキシ-5-(4-フルオロフェノキシ)吉草酸のメチルエステルのTIC及びマススペクトルを図7に示す。

【0228】更に、得られたPHAの分子量をゲルパーミエーションクロマトグラフィー (GPC; 東ソー H

<sup>1</sup>H-NMRスペクトル測定結果

LC-8020、カラム: ポリマーラボラトリー PL gel MIXED-C (5 $\mu$ m)、溶媒: クロロホルム、ポリスチレン換算) により評価した結果、Mn=68000、Mw=120000であった。

【0229】更に、核磁気共鳴装置 (NMR) を用いて以下の条件で得られたPHAの構造解析を行った。

<使用機器>

FT-NMR: Bruker DPX400

<sup>1</sup>H共鳴周波数: 400MHz

<測定条件>

測定核種: <sup>1</sup>H

使用溶媒: CDCl<sub>3</sub>

reference: キャピラリー封入TMS/CDCl<sub>3</sub>

測定温度: 室温

図8に<sup>1</sup>H-NMRスペクトルチャートを、表12に同定結果を示す。

【0230】

【表12】

共鳴周波数: 400MHz

Chemical Shift/ $\delta$ ppm	積分値/Int	type	同定結果
~1.55			不純物
2.00	2	m	d
2.59	2	d	b
3.86	2	m	c
5.36	1	m	c
6.74	2	m	h, j
6.90	2	t	g, k

m: multiplet

t: triplet

d: doublet

【0231】以上の結果により、本発明の方法により、FPxVAを原料とする、ポリ-3-ヒドロキシ-5-(4-フルオロフェノキシ)吉草酸のホモポリマー、及びその製造方法が示された。

【0232】(実施例C-3) H45株によるPHF P<sub>x</sub>Vホモポリマーの製造

酵母エキス (DIFCO製) 0.5重量%、FPxVA

0.1重量%とを含むM9培地200mlにH45株を接種し、30℃、125ストローク/分で振盪培養した。24時間後、菌体を遠心分離によって回収し、冷メ

タノールで一度洗浄して凍結乾燥し、秤量した。

【0233】この凍結乾燥ペレットを100mlのクロロホルムに懸濁し、60℃で20時間攪拌してPHAを抽出した。抽出液を孔径0.45 $\mu$ mのメンブレンフィルターでろ過した後、ロータリーエバポレーターで濃縮し、濃縮液を冷メタノール中で再沈殿させ、更に沈殿のみを回収して真空乾燥してPHAを得、これを秤量した。菌体及びポリマーの収率を表13に示す。

【0234】

【表13】

乾燥菌体 (mg/l)	乾燥ポリマー (mg/l)	収率 (乾燥ポリマー/乾燥菌体、%)
830	72	8.7

【0235】得られたPHAの組成は以下のようにして分析した。即ち、PHAサンプル5mgを25ml容ナス型フラスコに入れ、クロロホルム2ml及び硫酸を3% (v/v) 含むメタノール2mlを加えて100℃で3.5時間還流し、更に水を加えて分液した後、有機層をガスクロマトグラフィー質量分析装置 (GC-MS

S、島津QP-5050、カラム: DB-WAXETR (J&W社製)、EI法) で分析し、PHAモノマーユニットのメチルエステル化物の同定を行った。その結果、メインのピークは一本でありそのマススペクトルから3-ヒドロキシ-5-(4-フルオロフェノキシ)吉草酸のメチルエステル化物であることがわかった。GC

(86) 101-288256 (P2001-288256A)

-MSのトータルイオンクロマトグラフィー (TIC) 及びメイニークのマススペクトルを図9に示す。

【0236】更に、得られたPHAの分子量をゲルパーミューションクロマトグラフィー (GPC; 東ソー HLC-8020、カラム: ポリマーラボラトリー PL gel MIXED-C (5 $\mu$ m)、溶媒: クロロホルム、ポリスチレン換算) により評価した結果、 $M_n=67000$ 、 $M_w=119000$ であった。

【0237】以上に結果より、本発明の方法により、F P x VAを原料とする、ポリ-3-ヒドロキシ-5-(4-フルオロフェノキシ) 吉草酸のホモポリマー、及びその製造方法が示された。

D: 本発明のポリヒドロキシアルカノエートの製造方法を、式(18)の5-フェニル吉草酸 (PVA) を原料とする、式(9)で表される3-ヒドロキシ-5-フェニル吉草酸 (HPVA) に由来するモノマーユニットからなるポリヒドロキシアルカノエート: ポリ-3-ヒドロキシ-5-フェニル吉草酸 (PHPV) の製造に適用した一例を示す。

【0238】(実施例D-1) 酵母エキス (Difco 社製) 0.5%とPVA 0.05%を含むM9培地200mlにH45株を接種し、30℃、125ストローク

ク/分で振盪培養した。24時間後、菌体を遠心分離によって回収し、冷メタノールで一度洗浄して凍結乾燥した。

【0239】この凍結乾燥ペレットを100mlのクロロホルムに懸濁し、60℃で20時間攪拌してPHAを抽出した。抽出液を孔径0.45 $\mu$ mのメンブレンフィルターでろ過したのち、ロータリーエバポレーターで濃縮し、濃縮液を冷メタノール中で再沈殿させ、更に沈殿のみを回収して真空乾燥してPHAを得た。得られたPHAは、常法に従ってメタノリシスを行ったのち、ガスクロマトグラフィー-質量分析装置 (GC-MS、島津QP-5050、EI法) で分析し、PHAモノマーユニットのメチルエステル化物の同定を行った。また、このPHAの分子量を、ゲルパーミューションクロマトグラフィー (GPC; 東ソー・HLC-8020、カラム: ポリマーラボラトリー・PL gel MIXED-C・5 $\mu$ m、溶媒: クロロホルム、ポリスチレン換算分子量) により測定した。表14に、同定結果、平均分子量、ならびに凍結乾燥ペレット、回収ポリマーの収量、収率を示す。

【0240】

【表14】

*P. cichorii* H45株

菌体乾燥重量	1050 mg/L
ポリマー乾燥重量	310 mg/L
ポリマー乾燥重量/菌体乾燥重量	30%
ポリマー分子量	$M_n=1.5 \times 10^5$ $M_w=1.8 \times 10^5$
モノマーユニット組成 (エリア比)	
3-ヒドロキシ酪酸	0%
3-ヒドロキシ吉草酸	0%
3-ヒドロキシヘキサン酸	0%
3-ヒドロキシヘプタン酸	0%
3-ヒドロキシオクタン酸	0%
3-ヒドロキシノナン酸	0%
3-ヒドロキシデカン酸	0%
3-ヒドロキシ-5-フェニル吉草酸	100%

【0241】表14の結果から、菌体から抽出・回収されたポリマーは、PHAモノマーユニットとして、式(9)で表される3-ヒドロキシ-5-フェニル吉草酸に由来するモノマーユニットのみを含むことが確認される。

【0242】(実施例D-2) 酵母エキス (Difco 社製) 0.5%とPVA 0.1%を含むM9培地20

0mlにH45株を接種し、30℃、125ストローク/分で振盪培養した。24時間後、菌体を遠心分離によって回収し、PVA 0.2%を含む、窒素源 ( $\text{NH}_4\text{Cl}$ ) を含まないM9培地200mlに再懸濁して、更に30℃、125ストローク/分で振盪培養した。24時間後、菌体を遠心分離によって回収し、冷メタノールで一度洗浄して凍結乾燥した。

(37) 101-288256 (P2001-288256A)

【0243】この凍結乾燥ペレットを100mlのクロロホルムに懸濁し、60℃で20時間攪拌してPHAを抽出した。抽出液を孔径0.45μmのメンブレンフィルターでろ過したのち、ロータリーエバポレーターで濃縮し、濃縮液を冷メタノール中で再沈殿させ、更に沈殿のみを回収して真空乾燥してPHAを得た。得られたPHAは、常法に従ってメタノリシスを行ったのち、ガスクロマトグラフィー質量分析装置(GC-MS, 島津QP-5050, EI法)で分析し、PHAモノマーユニットのメチルエステル化物の同定を行った。また、こ

のPHAの分子量を、ゲルパーミエーションクロマトグラフィー(GPC; 東ソー・HLC-8020、カラム; ポリマーラボラトリー・PL gel・MIXED-C・5μm、溶媒: クロロホルム、ポリスチレン換算分子量)により測定した。表15に、同定結果、平均分子量、ならびに凍結乾燥ペレット、回収ポリマーの収量、収率を示す。

【0244】

【表15】

P. cichorii H45株

菌体乾燥重量	800 mg/L
ポリマー乾燥重量	320 mg/L
ポリマー乾燥重量/菌体乾燥重量	40%
ポリマー分子量	Mn=9.7×10 <sup>4</sup> Mw=2.1×10 <sup>5</sup>
モノマーユニット組成(エリア比)	
3-ヒドロキシ酪酸	0%
3-ヒドロキシ吉草酸	0%
3-ヒドロキシヘキサン酸	0%
3-ヒドロキシヘプタン酸	0%
3-ヒドロキシオクタン酸	0%
3-ヒドロキシノナン酸	0%
3-ヒドロキシデカン酸	0%
3-ヒドロキシ-5-フェニル吉草酸	100%

【0245】表15の結果から、菌体から抽出・回収されたポリマーは、PHAモノマーユニットとして、式(9)で表される3-ヒドロキシ-5-フェニル吉草酸に由来するモノマーユニットのみを含むことが確認される。

【0246】(実施例D-3) 酵母エキス(Difco社製)0.5%とPVA0.1%を含むM9培地200mlにP91株を植菌し、30℃、125ストローク/分で振盪培養した。24時間後、菌体を遠心分離によって回収し、PVA0.1%を含む、窒素源(NH<sub>4</sub>Cl)を含まないM9培地200mlに再懸濁して、更に30℃、125ストローク/分で振盪培養した。24時間後、菌体を遠心分離によって回収し、冷メタノールで一度洗浄して凍結乾燥した。

【0247】この凍結乾燥ペレットを100mlのクロロホルムに懸濁し、60℃で20時間攪拌してPHAを抽出した。抽出液を孔径0.45μmのメンブレンフィルターでろ過したのち、ロータリーエバポレーターで濃縮し、濃縮液を冷メタノール中で再沈殿させ、更に沈殿のみを回収して真空乾燥してPHAを得た。得られたPHAは、常法に従ってメタノリシスを行ったのち、ガスクロマトグラフィー質量分析装置(GC-MS, 島津QP-5050, EI法)で分析し、PHAモノマーユニットのメチルエステル化物の同定を行った。表16に、同定結果、ならびに凍結乾燥ペレット、回収ポリマーの収量、収率を示す。

【0248】

【表16】

(8) 101-288256 (P2001-288256A)

*P. putida* P91株

菌体乾燥重量	880 mg/L
ポリマー乾燥重量	96 mg/L
ポリマー乾燥重量/菌体乾燥重量	11%
モノマーユニット組成 (エリア比)	
3-ヒドロキシ酪酸	0%
3-ヒドロキシ吉草酸	0%
3-ヒドロキシヘキサン酸	0%
3-ヒドロキシヘプタン酸	0%
3-ヒドロキシオクタン酸	0%
3-ヒドロキシノナン酸	0%
3-ヒドロキシデカン酸	0%
3-ヒドロキシ-5-フェニル吉草酸	100%

【0249】表16の結果から、菌体から抽出・回収されたポリマーは、PHAモノマーユニットとして、式(9)で表される3-ヒドロキシ-5-フェニル吉草酸に由来するモノマーユニットのみを含むことが確認される。

【0250】(実施例D-4) 酵母エキス(Difco社製)0.5%とPVA0.1%とを含むM9培地200mlにP161株を接種し、30℃、125ストローク/分で振盪培養した。24時間後、菌体を遠心分離によって回収し、PVA0.1%を含む、窒素源(NH<sub>4</sub>Cl)を含まないM9培地200mlに再懸濁して、更に30℃、125ストローク/分で振盪培養した。24時間後、菌体を遠心分離によって回収し、冷メタノールで一度洗浄して凍結乾燥した。

【0251】この凍結乾燥ペレットを100mlのクロロホルムに懸濁し、60℃で20時間攪拌してPHAを抽出した。抽出液を孔径0.45μmのメンブレンフ

ルターでろ過したのち、ロータリーエバポレーターで濃縮し、濃縮液を冷メタノール中で再沈殿させ、更に沈殿のみを回収して真空乾燥してPHAを得た。得られたPHAは、常法に従ってメタノリシスを行ったのち、ガスクロマトグラフィー-質量分析装置(GC-MS、島津QP-5050、EI法)で分析し、PHAモノマーユニットのメチルエステル化物の同定を行った。また、このPHAの分子量を、ゲルパーミエーションクロマトグラフィー(GPC;東ソー・HLC-8020、カラム;ポリマーラボラトリー・PLgel・MIXED-C・5μm、溶媒;クロロホルム、ポリスチレン換算分子量)により測定した。表17に、同定結果、平均分子量、ならびに凍結乾燥ペレット、回収ポリマーの収量、収率を示す。

【0252】

【表17】

(第9) 01-288256 (P2001-288256A)

P. Jessen 11 P161株

菌体乾燥重量	650 mg/L
ポリマー乾燥重量	410 mg/L
ポリマー乾燥重量/菌体乾燥重量	63%
ポリマー分子量	Mn=4.9×10 <sup>4</sup>
	Mw=9.2×10 <sup>4</sup>

モノマーユニット組成 (エリア比)

3-ヒドロキシ酪酸	0%
3-ヒドロキシ吉草酸	0%
3-ヒドロキシヘキサ酸	0%
3-ヒドロキシヘプタン酸	0%
3-ヒドロキシオクタン酸	0%
3-ヒドロキシノナン酸	0%
3-ヒドロキシデカン酸	0%
3-ヒドロキシ-5-フェニル吉草酸	100%

【0253】表17の結果から、菌体から抽出・回収されたポリマーは、PHAモノマーユニットとして、式(9)で表される3-ヒドロキシ-5-フェニル吉草酸に由来するモノマーユニットのみを含むことが確認される。

【0254】(実施例D-5) H45株により産生されたPHPVについて、核磁気共鳴装置 (FT-NMR; Bruker DPX400) を用いて、以下の条件で

<sup>1</sup>H-NMRスペクトル測定結果

分析した。測定核種: <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C、使用溶媒: 重クロロホルム (TMS入り)。その測定結果を、図10に<sup>1</sup>H-NMRスペクトル測定結果、表18にその帰属を、図11に<sup>13</sup>C-NMRスペクトル測定結果、表19にその帰属をそれぞれ示す。

【0255】

【表18】

共鳴周波数: 400MHz

δ値 (ppm)	帰属
0.9~1.7	ブロードピーク → 不純物
1.9	m: 2H, -CH <sub>2</sub> - → d
2.4~2.6	m: 4H, -CH <sub>2</sub> -2個 → b, e
5.2~5.9	m: 1H, -OCH → c
6.9~7.0	m: 3H, ベンゼン環のプロトン → h, i, j
7.1	m: 2H, ベンゼン環のプロトン → g, k
7.3	s: 溶媒 (CDCl <sub>3</sub> )

m: multiplet, s: singlet

【0256】

【表19】

(特0)101-288256 (P2001-288256A)

<sup>13</sup>C-NMRスペクトル測定結果

共鳴周波数: 100 MHz

δ値 (ppm)	帰属
31.8	-CH <sub>2</sub> → d
35.8	-CH <sub>2</sub> → c
29.4	-CH <sub>2</sub> → b
70.9	-CH → e
77.1~77.7	溶媒 (CDCl <sub>3</sub> )
126.5	ベンゼン環の-CH → i
128.7~128.9	ベンゼン環の-CH → g, h, j, k
141.3	ベンゼン環のC → f
169.7	カルボニル基-C=O → a

【0257】この測定結果からも、菌体から抽出・回収されたポリマーは、PHAモノマーユニットとして、式(9)で表される3-ヒドロキシ-5-フェニル吉草酸に由来するモノマーユニットのみを含んでなる、ポリ-3-ヒドロキシ-5-フェニル吉草酸であることが判る。

E: 本発明のポリヒドロキシアルカノエートの製造方法を、式(19)の5-(4-フルオロフェニル)吉草酸(FPVA)を原料とする、式(7)で表される3-ヒドロキシ-5-(4-フルオロフェニル)吉草酸(HFPVA)に由来するモノマーユニットからなるポリヒドロキシアルカノエート: ポリ-3-ヒドロキシ-5-(4-フルオロフェニル)吉草酸(PHFPV)の製造に適用した一例を示す。

【0258】(実施例E-1) まず、Macromolecules, 29, 1762-1766 (1996) 及び同, 27, 45-49 (1994) の方法に従って、グリニャール反応により基質であるFPVAを合成した。即ち、5-ブロモ吉草酸を無水テトラヒドロ

フラン (THF) に溶解させ、-20℃、アルゴン雰囲気下で3M メチルマグネシウムクロリドTHF溶液を滴下しながら加えた。約15分間攪拌した後、1-ブロモ-4-フルオロベンゼンとマグネシウムのTHF溶液を更に滴下し、0.1M Li<sub>2</sub>CuCl<sub>4</sub>のTHF溶液を加えた(温度は-20℃に保持)。この反応液を室温まで戻し、更に一晩攪拌した。その後、溶液を氷冷した20%硫酸水溶液に注加し、攪拌して、水層を採取して食塩で飽和し、エーテルで抽出した。更に抽出液を50gの水酸化カリウムを加えた100mLの脱イオン水で抽出した後、20%硫酸水溶液で酸性化して、沈殿部分を回収した。

【0259】この沈殿部分を核磁気共鳴装置 (FT-NMR: Bruker DPX400) を用いて、以下の条件で分析した。測定核種: <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C、使用溶媒: 重クロロホルム (TMS入り)。その結果を図13及び表20に示す。

【0260】

【表20】

化学シフト/ppm	type	帰属結果
1.67	m	c, d
2.39	t	b
2.62	t	e
6.97	t	h, j
7.12	t	g, k
10.7	broad	COOH

【0261】(実施例E-2) 酵母エキス (Difco 社製) 0.5%、FPVA 0.1% とを含むM9培地200mlにH45株を植菌し、30℃、125ストローク/分で振盪培養した。24時間後、菌体を遠心分離によって回収し、冷メタノールで一度洗浄して凍結乾燥した。

【0262】この凍結乾燥ペレットを100mlのクロロホルムに懸濁し、60℃で20時間攪拌してPHAを抽出した。抽出液を孔径0.45μmのメンブレンフィルターでろ過したのち、ロータリーエバポレーターで濃

縮し、濃縮液を冷メタノール中で再沈殿させ、更に沈殿のみを回収して真空乾燥してPHAを得た。得られたPHAは、常法に従ってメタノリシスを行ったのち、ガスクロマトグラフィー質量分析装置 (GC-MS, 島津QP-5050、EI法) で分析し、PHAモノマーユニットのメチルエステル化物の同定を行った。その結果を表21に示す。

【0263】

【表21】

(株1)01-288256 (P2001-288256A)

*P. cichorii* H45株

菌体乾燥重量	1310mg/L
ポリマー乾燥重量	270 mg/L
ポリマー乾燥重量/菌体乾燥重量	21%
モノマーユニット組成 (エリア比)	
3-ヒドロキシ酪酸	0%
3-ヒドロキシ吉草酸	0%
3-ヒドロキシヘキサノ酸	0%
3-ヒドロキシヘプタン酸	0%
3-ヒドロキシオクタン酸	0%
3-ヒドロキシノナン酸	0%
3-ヒドロキシデカン酸	0%
3-ヒドロキシ-	
5-(4-フルオロフェニル) 吉草酸	100%

【0264】(実施例E-3) 酵母エキス(Difco社製) 0.5%、FPVA 0.1%を含むM9培地200mlにP91株を接種し、30℃、125ストローク/分で振盪培養した。24時間後、菌体を遠心分離によって回収し、FPVA 0.1%を含む、窒素源(NH<sub>4</sub>Cl)を含まないM9培地200mlに再懸濁して、更に30℃、125ストローク/分で振盪培養した。24時間後、菌体を遠心分離によって回収し、冷メタノールで一度洗浄して凍結乾燥した。

【0265】この凍結乾燥ペレットを100mlのクロホルムに懸濁し、60℃で20時間攪拌してPHAを

抽出した。抽出液を孔径0.45μmのメンブレンフィルターでろ過したのち、ロータリーエバポレーターで濃縮し、濃縮液を冷メタノール中で再沈殿させ、更に沈殿のみを回収して真空乾燥してPHAを得た。得られたPHAは、常法に従ってメタノリシスを行ったのち、ガスクロマトグラフィー-質量分析装置(GC-MS、島津QP-5050、EI法)で分析し、PHAモノマーユニットのメチルエステル化物の同定を行った。その結果を表2.2に示す。

【0266】

【表2.2】

*P. putida* P91株

菌体乾燥重量	430mg/L
ポリマー乾燥重量	17 mg/L
ポリマー乾燥重量/菌体乾燥重量	4%
モノマーユニット組成 (エリア比)	
3-ヒドロキシ酪酸	0%
3-ヒドロキシ吉草酸	0%
3-ヒドロキシヘキサノ酸	0%
3-ヒドロキシヘプタン酸	0%
3-ヒドロキシオクタン酸	0%
3-ヒドロキシノナン酸	0%
3-ヒドロキシデカン酸	0%
3-ヒドロキシ-	
5-(4-フルオロフェニル) 吉草酸	100%

【0267】(実施例E-4) 酵母エキス(Difco

社製) 0.5%、FPVA 0.1%を含むM9培地2



(表2) 01-288256 (P2001-288256A)

00mlにP161株を接種し、30℃、125ストローク/分で振盪培養した。24時間後、菌体を遠心分離によって回収し、FPVA0.1%を含む、窒素源(NH<sub>4</sub>Cl)を含まないM9培地200mlに再懸濁し、更に30℃、125ストローク/分で振盪培養した。24時間後、菌体を遠心分離によって回収し、冷メタノールで一度洗浄して凍結乾燥した。

【0268】この凍結乾燥ペレットを100mlのクロロホルムに懸濁し、60℃で20時間攪拌してPHAを抽出した。抽出液を孔径0.45μmのメンブレンフィ

ルターでろ過した後、ロータリーエバポレーターで濃縮し、濃縮液を冷メタノール中で再沈殿させ、更に沈殿のみを回収して真空乾燥してPHAを得た。得られたPHAは、常法に従ってメタノリシスを行ったのち、ガスクロマトグラフィー-質量分析装置(GC-MS, 島津QP-5050, EI法)で分析し、PHAモノマーユニットのメチルエステル化物の同定を行った。その結果を表23に示す。

【0269】

【表23】

P. jessenii P161株

菌体乾燥重量	780mg/L
ポリマー乾燥重量	330mg/L
ポリマー乾燥重量/菌体乾燥重量	42%
モノマーユニット組成(エリア比)	
3-ヒドロキシ酪酸	0%
3-ヒドロキシ吉草酸	0%
3-ヒドロキシヘキサ酸	0%
3-ヒドロキシヘプタン酸	0%
3-ヒドロキシオクタン酸	0%
3-ヒドロキシノナン酸	0%
3-ヒドロキシデカン酸	0%
3-ヒドロキシ-	
5-(4-フルオロフェニル)吉草酸	100%

【0270】(実施例E-5) H45株由来のPHFPVについて、核磁気共鳴装置(FT-NMR: Bruker DPX400)を用いて、以下の条件で分析した。測定核種: <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C、使用溶媒: 重クロロホルム

<sup>1</sup>H-NMRスペクトル測定結果

(TMS入り)。その結果を、図14、表24、図15、表25に示す。

【0271】

【表24】

共鳴周波数: 400MHz

δ値(ppm)	帰属
0.9~1.7	ブロードピーク → 不純物
1.8~1.9	m; 2H, -CH <sub>2</sub> → d
2.4~2.6	m; 4H, -CH <sub>2</sub> 2個 → b, e
5.2~5.9	m; 1H, -OCH → c
6.9~7.0	l; 2H, ベンゼン環のオルト位プロトン → h, j
7.1	t; 2H, ベンゼン環のメタ位プロトン → g, k
7.3	s; 溶媒(CDCl <sub>3</sub> )

m: multiplet

t: triplet

s: singlet

【0272】

【表25】

(43) 01-288256 (P2001-288256A)

 $^{13}\text{C}$ -NMRスペクトル測定結果

共鳴周波数: 100 MHz

$\delta$ 値 (ppm)	帰 属
31.0	$-\text{CH}_2 \rightarrow \text{d}$
35.9	$-\text{CH}_2 \rightarrow \text{e}$
39.4	$-\text{CH}_2 \rightarrow \text{b}$
70.5	$-\text{CH} \rightarrow \text{c}$
77.1~77.7	溶媒 ( $\text{CDCl}_3$ )
115.8, 115.7	ベンゼン環のオルト位 $-\text{CH} \rightarrow \text{h, i}$
130.0	ベンゼン環のメタ位 $-\text{CH} \rightarrow \text{g, k}$
136.3	ベンゼン環のパラ位のC $\rightarrow \text{f}$
160.5, 163.0	エステル位の $-\text{C} \rightarrow \text{l}$
169.7	カルボニル基 $-\text{C}=\text{O} \rightarrow \text{a}$

【0273】F: 本発明のポリヒドロキシアルカノエートの製造方法を、式(20)の4-シクロヘキシル酪酸( $\text{CHBA}$ )を原料とする、式(8)で表される3-ヒドロキシ-4-シクロヘキシル酪酸( $\text{HCHBA}$ )に由来するモノマーユニットからなるポリヒドロキシアルカノエートの製造に適用した一例を示す。

【0274】(実施例F-1) YN2株による3-ヒドロキシ-4-シクロヘキシル酪酸ユニットを含むPHAの生産(一段階培養)

酵母エキス0.1%を含むM9寒天培地上のYN2株のコロニーを、酵母エキス0.5%、4-シクロヘキシル酪酸0.1%を含むM9液体培地(200 mL)に接種し、30℃で培養した。24時間後、菌体を遠心分離によって収穫し、メタノールで一度洗浄して凍結乾燥した。

【0275】この凍結乾燥ペレットを秤量した後、100 mLのクロロホルムに懸濁し、60℃で20時間攪拌してPHAを抽出した。抽出液を0.45  $\mu\text{m}$ のフィルターでろ過した後、エバポレーターで濃縮し、濃縮液を冷メタノール中で再沈殿させ、ポリマーを得た。このポリマーを室温で減圧乾燥し、秤量した。表26に、凍結乾燥ペレット、回収ポリマーの収量、ならびに収率を示す。

【0276】

【表26】

CDW	PDW	収率
1100	225	20.5

【0277】CDW: 乾燥菌体重量 (mg/L)、  
PDW: 乾燥ポリマー重量 (mg/L)、  
収率: PDW/CDW (%)

上で述べた従来の報告例(表2)では、3-ヒドロキシ-4-シクロヘキシル酪酸ユニットを含むPHAの収量は、培養液1 Lあたり89.1 mgであったが、本実施例の結果は、その約2.5倍に上る収量を得ることができている。また、乾燥菌体当たりの収率自体も、大幅な向上がなされている。

【0278】得られたPHAの組成は以下のようにして

分析した。すなわち、約10 mgのPHAを25 mL容量型フラスコに入れ、クロロホルム2 mLに溶解させ、3%硫酸を含むメタノール溶液2 mLを加えて、100℃で還流しながら3.5時間反応させた。反応終了後、脱イオン水10 mLを加えて激しく10分間振とうした後に、2層に分離した下層のクロロホルム層を取り出し、硫酸マグネシウムで脱水した後、このクロロホルム層をガスクロマトグラフィー-質量分析装置(GC-MS, 島津QP-5050, EI法)にかけて、PHAモノマーユニットのメチルエステル化物の同定を行った。その結果、PHAモノマーユニットとしては、98%が式(8)で表される3-ヒドロキシ-4-シクロヘキシル酪酸のユニットであり、2%が3-ヒドロキシ酪酸のユニットであった。また、シクロヘキシルメタノールが若干量混在していた。

【0279】以上の結果より、本発明の製造方法により、3-ヒドロキシ-4-シクロヘキシル酪酸ユニットを非常に高い割合で含むPHAが得られることがわかる。本発明の方法における酵母エキス添加の効果が確認された。加えて、培養液当たりの収量、乾燥菌体当たりの収率の十分に向上しており、本発明の製造方法は、3-ヒドロキシ-4-シクロヘキシル酪酸ユニットの含有率の高さ、収量の高さの双方において、高効率な製造方法であることが確認される。

【0280】H45株による3-ヒドロキシ-4-シクロヘキシル酪酸ユニットを含むPHAの生産(一段階培養)

酵母エキス0.1%を含むM9寒天培地上のH45株のコロニーを、酵母エキス0.5%、4-シクロヘキシル酪酸0.1%を含むM9液体培地(200 mL)に接種し、30℃で培養した。24時間後、菌体を遠心分離によって収穫し、メタノールで一度洗浄して凍結乾燥した。

【0281】この凍結乾燥ペレットを秤量した後、100 mLのクロロホルムに懸濁し、60℃で20時間攪拌してPHAを抽出した。抽出液を0.45  $\mu\text{m}$ のフィルターでろ過した後、エバポレーターで濃縮し、濃縮液を冷メタノール中で再沈殿させ、ポリマーを得た。このポ

(44) 101-288256 (P2001-288256A)

リマーを室温で減圧乾燥し、秤量した。表27に、凍結乾燥ペレット、回収ポリマーの収量、ならびに収率を示す。

【0282】

【表27】

CDW	PDW	収率
800	120	15.0

【0283】CDW: 乾燥菌体重量 (mg/L)、

PDW: 乾燥ポリマー重量 (mg/L)、

収率: PDW/CDW (%)

上で述べた従来の報告例 (表2) では、3-ヒドロキシ-4-シクロヘキシル酪酸由来のユニットを含むPHAの収量は、培養液1Lあたり89.1 mgであったが、本実施例の結果は、その約1.3倍に上る収量を得ることができている。また、乾燥菌体当たりの収率自体も、向上がなされている。

【0284】得られたPHAの組成は以下のようにして分析した。すなわち、約10 mgのPHAを25 mL容ナス型フラスコに入れ、クロロホルム2 mLに溶解させ、3%硫酸を含むメタノール溶液2 mLを加えて、100℃で還流しながら3.5時間反応させた。反応終了後、脱イオン水10 mLを加えて激しく10分間振とうした後に、2層に分離した下層のクロロホルム層を取り出し、硫酸マグネシウムで脱水した後、このクロロホルム層をガスクロマトグラフィー質量分析装置 (GC-MS, 島津QP-5050, EI法) にかけて、PHAモノマーユニットのメチルエステル化物の同定を行った。その結果、PHAモノマーユニットとしては、97%が式(8)に表される3-ヒドロキシ-4-シクロヘキシル酪酸に由来するユニットであり、3%が3-ヒドロキシ酪酸に由来するユニットであった。また、シクロヘキシルメタノールが若干量混在していた。

【0285】以上の結果より、H45株においても、本発明の製造方法により、式(8)に表される3-ヒドロキシ-4-シクロヘキシル酪酸に由来するユニットを非常に高い割合で含むPHAが得られることがわかる。

【0286】P161株による3-ヒドロキシ-4-シクロヘキシル酪酸ユニットを含むPHAの生産 (一段増培養)

酵母エキス0.1%を含むM9寒天培地上のP161株のコロニーを、酵母エキス0.5%、4-シクロヘキシル酪酸0.1%を含むM9液体培地 (200 mL) に植菌し、30℃で培養した。24時間後、菌体を遠心分離によって収穫し、メタノールで一度洗浄して凍結乾燥した。

【0287】この凍結乾燥ペレットを秤量した後、100 mLのクロロホルムに懸濁し、60℃で20時間攪拌してPHAを抽出した。抽出液を0.45 μmのフィルターでろ過した後、エバポレーターで濃縮し、濃縮液を

冷メタノール中で再沈殿させ、ポリマーを得た。このポリマーを室温で減圧乾燥し、秤量した。表28に、凍結乾燥ペレット、回収ポリマーの収量、ならびに収率を示す。

【0288】

【表28】

CDW	PDW	収率
750	130	17.3

【0289】CDW: 乾燥菌体重量 (mg/L)、

PDW: 乾燥ポリマー重量 (mg/L)、

収率: PDW/CDW (%)

上で述べた従来の報告例 (表2) では、3-ヒドロキシ-4-シクロヘキシル酪酸に由来するユニットを含むPHAの収量は、培養液1Lあたり89.1 mgであったが、本実施例の結果は、その約1.5倍に上る収量を得ることができている。また、乾燥菌体当たりの収率自体も、向上がなされている。

【0290】得られたPHAの組成は以下のようにして分析した。すなわち、約10 mgのPHAを25 mL容ナス型フラスコに入れ、クロロホルム2 mLに溶解させ、3%硫酸を含むメタノール溶液2 mLを加えて、100℃で還流しながら3.5時間反応させた。反応終了後、脱イオン水10 mLを加えて激しく10分間振とうした後に、2層に分離した下層のクロロホルム層を取り出し、硫酸マグネシウムで脱水した後、このクロロホルム層をガスクロマトグラフィー質量分析装置 (GC-MS, 島津QP-5050, EI法) にかけて、PHAモノマーユニットのメチルエステル化物の同定を行った。その結果、PHAモノマーユニットとしては、94%が式(8)に表される3-ヒドロキシ-4-シクロヘキシル酪酸に由来するユニットであり、6%が3-ヒドロキシ酪酸のユニットであった。また、シクロヘキシルメタノールが若干量混在していた。

【0291】以上の結果より、P161株においても、本発明の製造方法により、式(8)に表される3-ヒドロキシ-4-シクロヘキシル酪酸由来のユニットを非常に高い割合で含むPHAが得られることがわかる。

【0292】(実施例F-2) YN2株による3-ヒドロキシ-4-シクロヘキシル酪酸ユニットを含むPHAの生産 (二段増培養)

酵母エキス0.1%を含むM9寒天培地上のYN2株のコロニーを、酵母エキス0.5%、4-シクロヘキシル酪酸0.1%を含むM9液体培地 (200 mL) に植菌し、30℃で培養した。24時間後、菌体を遠心分離によって収穫し、M9培地よりNaCl及びNH<sub>4</sub>Clを除いた成分の溶液に4-シクロヘキシル酪酸0.1%を加えた培地中に移し、30℃で21時間培養した。得られた菌体をメタノールで一度洗浄して凍結乾燥した。

【0293】この凍結乾燥ペレットを秤量した後、実施

(45) 01-288256 (P2001-288256A)

例F-1と同様の方法でポリマーを回収した。このポリマーを室温で減圧乾燥し、秤量した。表29に、凍結乾燥ベレット、回収ポリマーの収量、ならびに収率を示す。

【0294】

【表29】

CDW	PDW	収率
1100	285	25.9

【0295】CDW：乾燥菌体重量 (mg/L)、

PDW：乾燥ポリマー重量 (mg/L)、

収率：PDW/CDW (%)

上で述べた従来の報告例 (表2) では、3-ヒドロキシ-4-シクロヘキシル酪酸由来のユニットを含むPHAの収量は、培養液1Lあたり89.1 mgであったが、本実施例の結果は、その約3.2倍に上る収量を得ることができている。また、乾燥菌体当たりの収率自体も、大幅な向上がなされている。

【0296】得られたPHAの組成を実施例F-1と同様の方法で評価した。その結果、PHAモノマーユニットとしては、99%が式(8)に表される3-ヒドロキシ-4-シクロヘキシル酪酸に由来するユニットであり、1%が3-ヒドロキシ酪酸のユニットであった。また、シクロヘキシルメタノールが若干量混在していた。

【0297】さらに得られたポリマーの分子量をGPC (東ソー HLC-8020、カラム：ポリマーラボラトリー PL gel MIXED-C (5 $\mu$ m)、溶媒：クロロホルム、ポリスチレン換算) により評価したところ、 $M_n=490000$ 、 $M_w=1000000$ であった。

【0298】以上の結果より、本発明の製造方法により、式(8)に表される3-ヒドロキシ-4-シクロヘキシル酪酸に由来するユニットを非常に高い割合で含むPHAが得られることがわかる。本発明の方法における酵母エキスを添加の効果が確認された。加えて、培養液当たりの収量、乾燥菌体当たりの収率の十分に向上してお

り、本発明の製造方法は、3-ヒドロキシ-4-シクロヘキシル酪酸ユニットの含有率の高さ、収量の高さの双方において、高効率な製造方法であることが確認される。

【0299】本実施例と実施例F-1を対比することで、予め酵母エキスおよび4-シクロヘキシル酪酸を含む無機塩液体培地で培養した後、集菌した微生物を酵母エキス添加しない無機塩培地中で培養するという手法を採っても、得られるPHAは、3-ヒドロキシ-4-シクロヘキシル酪酸ユニットを非常に高い割合で含むという効果が達成されることが確認される。

【0300】 (実施例F-3)

3-ヒドロキシ-4-シクロヘキシル酪酸ユニットからなるPHAの精製及びそのNMR分析  
実施例F-2で得られたポリマーから、混入しているPHB (ポリ 3-ヒドロキシ酪酸) 成分及びシクロヘキシルメタノールと考えられる成分を除去するため、以下のような精製操作を行った。

【0301】すなわち、ポリマーをアセトン中に懸濁し、60℃で24時間抽出した。遠心分離により上澄を回収し、沈殿した部分は再度アセトンにより抽出操作を行った。この操作を合計5回繰り返して、上澄を集めてエバポレーターにより濃縮乾燥させた。乾燥した試料を少量のクロロホルムに溶解させ、冷メタノール中で再沈殿させた。本操作を3回繰り返して、得られたポリマーを減圧乾燥した。得られた乾燥ポリマーを秤量したところ、281 mgであった。

【0302】このポリマーの $^1\text{H}$ -NMR及び $^{13}\text{C}$ -NMRの測定を行った (FT-NMR: Bruker DPX400、使用溶媒：重クロロホルム (TMS入り))。  $^1\text{H}$ -NMRのチャートを図16に、その帰属を表30に、 $^{13}\text{C}$ -NMRのチャートを図17に、その帰属を表31にそれぞれ示す。

【0303】

【表30】

 $^1\text{H}$ スペクトル測定結果

共鳴周波数: 400 MHz

$\delta$ 値 (ppm)	帰属
0.9~1.8	m; 11H, -CH <sub>2</sub> 5個 → f, g, h, i, j -CH → e
1.5~1.7	m; 2H, -CH <sub>2</sub> → d
2.5~2.6	dd; 2H, -CH <sub>2</sub> → b (ヘキシル基との隣接H-Hスピン結合のためさらに分裂)
5.2~5.3	m; 1H, -OCH → c

d: doublet, dd: double doublet

【0304】

【表31】

(46) 01-288256 (P2001-288256A)

<sup>13</sup>C スペクトル測定結果

共鳴周波数: 100 MHz

δ 値 (ppm)	帰属
26.4~24.3	ヘキシル基の -CH <sub>2</sub> -, -CH- → e~j
40.1	-CH <sub>2</sub> → d
41.9	-CH <sub>2</sub> → b
69.8	-CH → c
77.1~77.7	溶媒 (CDCl <sub>3</sub> )
169.8	カルボニル基 -C=O → a

【0305】この評価により、上記の精製操作により、混入している PHB (ポリ 3-ヒドロキシ酪酸) 成分及びシクロヘキシルメタノールと考えられる成分が除かれ、3-ヒドロキシ-4-シクロヘキシル酪酸ユニットからなる PHA が回収されたと判断される。

G: 本発明のポリヒドロキシアルカノエートの製造方法を、7-フェノキシヘプタン酸 (PxHpA) を原料とする、3-ヒドロキシ-7-フェノキシヘプタン酸 (3HPxHp) ならびに 3-ヒドロキシ-5-フェノキシ吉草酸 (3HPxV) に由来するモノマーユニットからなるポリヒドロキシアルカノエート: 3-ヒドロキシ-7-フェノキシヘプタン酸 (3HPxHp) ならびに 3-ヒドロキシ-5-フェノキシ吉草酸 (3HPxV) からなるコポリマーの製造に適用した一例を示す。

【0306】(実施例 G-1) YN2 株による P (HPxV/HPxHp) ポリマーの生産 (酵母エキス段階培養)

酵母エキス (Difco 社製) 0.5%、7-フェノキシヘプタン酸 (PxHpA) 0.1% とを含む M9 培地 200 ml に YN2 株を植菌し、30℃、125 ストローク/分で振盪培養した。64 時間後、菌体を遠心分離によって回収し、冷メタノールで一度洗浄して凍結乾燥し、秤量した。

【0307】この凍結乾燥ペレットを 100 ml のアセトンに懸濁し、室温 (23℃) で 72 時間攪拌してポリマーを抽出した。抽出液を孔径 0.45 μm のメンブレンフィルターでろ過したのち、ロータリーエバポレーターで濃縮し、濃縮液を冷メタノール中で再沈殿させ、更に沈殿のみを回収して真空乾燥してポリマーを得、これ

を秤量した。

【0308】得られたポリマーの分子量は、ゲルパーミエーションクロマトグラフィー (GPC; 東ソー・HLC-8020、カラム: ポリマーラボラトリー・PL gel 1・MIXED-C・5 μm、溶媒: クロロホルム、ポリスチレン換算分子量) により測定した。

【0309】得られたポリマーのユニット組成は以下のようにして分析した。即ち、ポリマーサンプル 5 mg を 25 ml 容ナス型フラスコに入れ、クロロホルム 2 ml 及び硫酸を 3% (v/v) 含むメタノール 2 ml を加えて 100℃ で 3.5 時間還流し、更に水を加えて分液した後、有機層をガスクロマトグラフィー-質量分析装置 (GC-MS、島津 QP-5050、カラム: DB-WAXETR (J&W 社製)、EI 法) で分析し、PHA モノマーユニットのメチルエステル化物の同定を行った。菌体及びポリマーの収率、モノマーユニットの分析結果を表 32 に示す。また、GC-MS 測定より得られた、3-ヒドロキシ-5-フェノキシ吉草酸 (3HPxV) メチルエステル、3-ヒドロキシ-7-フェノキシヘプタン酸 (3HPxHp) メチルエステルのマススペクトルを、図 18 及び図 19 にそれぞれ示す。

【0310】この結果から、YN2 株により、7-フェノキシヘプタン酸を基質として 3-ヒドロキシ-5-フェノキシ吉草酸 (3HPxV) 及び 3-ヒドロキシ-7-フェノキシヘプタン酸 (3HPxHp) の 2 ユニットのみからなる PHA コポリマーを生産し得ることが示された。

【0311】

【表 32】

(表7) 01-288256 (P2001-288256A)

菌体乾燥重量 (mg/L)	1295
ポリマー乾燥重量 (mg/L)	950
数平均分子量 (Mn) $\times 10^4$	3.9
重量平均分子量 (Mw) $\times 10^4$	8.1
3-ヒドロキシ-5-フェノキシ吉草酸 (%)	60.0
3-ヒドロキシ-7-フェノキシヘプタン酸 (%)	40.0

【0312】(実施例G-2) H45株によるP(H P $\times$ V/H P $\times$ Hp)ポリマーの生産(酵母エキス一段増培養)

酵母エキス(Difco社製)0.5%、7-フェノキシヘプタン酸(P $\times$ HpA)0.1%とを含むM9培地200mlにH45株を接種し、30℃、125ストローク/分で振盪培養した。64時間後、菌体を遠心分離によって回収し、冷メタノールで一度洗浄して凍結乾燥し、秤量した。

【0313】この凍結乾燥ペレットを100mlのアセトンに懸濁し、室温(23℃)で72時間攪拌してポリマーを抽出した。抽出液を孔径0.45 $\mu$ mのメンブレンフィルターでろ過したのち、ロータリーエバポレーターで濃縮し、濃縮液を冷メタノール中で再沈殿させ、更に沈殿のみを回収して真空乾燥してポリマーを得、これを秤量した。

【0314】得られたポリマーの分子量は、ゲルパーミエーションクロマトグラフィー(GPC;東ソー・HLC-8020、カラム:ポリマーラボラトリー・PL gel-MIXED-C $\cdot$ 5 $\mu$ m、溶媒:クロロホルム、ポリスチレン換算分子量)により測定した。

【0315】得られたポリマーのユニット組成は以下の

菌体乾燥重量 (mg/L)	1070
ポリマー乾燥重量 (mg/L)	236
数平均分子量 (Mn) $\times 10^4$	2.9
重量平均分子量 (Mw) $\times 10^4$	5.7
3-ヒドロキシ-5-フェノキシ吉草酸 (%)	27.9
3-ヒドロキシ-7-フェノキシヘプタン酸 (%)	72.1

【0318】H:本発明のポリヒドロキシアルカノエートの製造方法を、8-フェノキシオクタン酸(P $\times$ O A)を原料とする、3-ヒドロキシ-4-フェノキシ酪酸(3HP $\times$ B)、3-ヒドロキシ-6-フェノキシヘキサン酸(3HP $\times$ Hx)、3-ヒドロキシ-8-フェノキシオクタン酸(3HP $\times$ O)の三種に由来するモノ

ようにして分析した。即ち、ポリマーサンプル5mgを25ml容ナス型フラスコに入れ、クロロホルム2ml及び硫酸を3%(v/v)含むメタノール2mlを加えて100℃で3.5時間還流し、更に水を加えて分液した後、有機層をガスクロマトグラフィー質量分析装置(GC-MS、島津QP-5050、カラム:DB-WAXETR(J&W社製)、EI法)で分析し、PHAモノマーユニットのメチルエステル化物の同定を行った。菌体及びポリマーの収率、モノマーユニットの分析結果を表33に示す。また、GC-MS測定より得られた、3-ヒドロキシ-5-フェノキシ吉草酸(3HP $\times$ V)メチルエステル、3-ヒドロキシ-7-フェノキシヘプタン酸(3HP $\times$ Hp)メチルエステルのマススペクトルを、図20及び図21にそれぞれ示す。

【0316】この結果から、H45株により、7-フェノキシヘプタン酸を基質として3-ヒドロキシ-5-フェノキシ吉草酸(3HP $\times$ V)及び3-ヒドロキシ-7-フェノキシヘプタン酸(3HP $\times$ Hp)の2ユニットのみからなるPHAコポリマーを生産し得ることが示された。

【0317】

【表33】

マーユニットからなるポリヒドロキシアルカノエート:3-ヒドロキシ-4-フェノキシ酪酸(3HP $\times$ B)、3-ヒドロキシ-6-フェノキシヘキサン酸(3HP $\times$ Hx)ならびに3-ヒドロキシ-8-フェノキシオクタン酸(3HP $\times$ O)からなるコポリマーの製造に適用した一例を示す。

(48) 01-288256 (P2001-288256A)

【0319】(実施例H-1) YN2株によるP(H PxB/H P x H x /HP x O)ポリマーの生産(酵母エキス段階培養)

酵母エキス(Difco社製)0.5%、8-フェノキシオクタン酸(P x OA)0.1%を含むM9培地200mlにYN2株を接種し、30℃、125ストローク/分で振盪培養した。24時間後、菌体を遠心分離によって回収し、冷メタノールで一度洗浄して凍結乾燥し、秤量した。

【0320】この凍結乾燥ペレットを100mlのアセトンに懸濁し、室温(23℃)で72時間攪拌してポリマーを抽出した。抽出液を孔径0.45μmのメンブレンフィルターでろ過したのち、ロータリーエバポレーターで濃縮し、濃縮液を冷メタノール中で再沈殿させ、更に沈殿のみを回収して真空乾燥してポリマーを得、これを秤量した。

【0321】得られたポリマーの分子量は、ゲルパーミエーションクロマトグラフィー(GPC;東ソー・HLC-8020、カラム:ポリマーラボラトリー・PLGel-MIXED-C・5μm、溶媒:クロロホルム、ポリスチレン換算分子量)により測定した。

【0322】得られたポリマーのユニット組成は以下のようにして分析した。即ち、ポリマーサンプル5mgを25ml容ナス型フラスコに入れ、クロロホルム2ml

及び硫酸を3%(v/v)含むメタノール2mlを加えて100℃で3.5時間還流し、更に水を加えて分液した後、有機層をガスクロマトグラフィー質量分析装置(GC-MS、島津QP-5050、カラム:DB-WAXETR(J&W社製)、EI法)で分析し、PHAモノマーユニットのメチルエステル化物の同定を行った。菌体及びポリマーの収率、モノマーユニットの分析結果を表34に示す。また、GC-MS測定より得られた、3-ヒドロキシ-4-フェノキシ酪酸(3HPxB)メチルエステル、3-ヒドロキシ-6-フェノキシヘキサン酸(3HPxHx)メチルエステル、3-ヒドロキシ-8-フェノキシオクタン酸(3HPxO)メチルエステルのマススペクトルを図22、図23及び図24に示す。

【0323】この結果から、YN2株により、8-フェノキシオクタン酸を基質として3-ヒドロキシ-4-フェノキシ酪酸(3HPxB)、3-ヒドロキシ-6-フェノキシヘキサン酸(3HPxHx)及び3-ヒドロキシ-8-フェノキシオクタン酸(3HPxO)の3ユニットのみからなるPHAコポリマーを生産し得ることが示された。

【0324】

【表34】

菌体乾燥重量 (mg/L)	1316
ポリマー乾燥重量 (mg/L)	415
数平均分子量 (Mn) × 10 <sup>4</sup>	2.5
重量平均分子量 (Mw) × 10 <sup>4</sup>	5.5
3-ヒドロキシ-4-フェノキシ酪酸 (%)	2.2
3-ヒドロキシ-6-フェノキシヘキサン酸 (%)	68.7
3-ヒドロキシ-8-フェノキシオクタン酸 (%)	29.1

【0325】(実施例H-2) H45株によるP(H PxB/H P x H x /HP x O)ポリマーの生産(酵母エキス段階培養)

酵母エキス(Difco社製)0.5%、8-フェノキシオクタン酸(P x OA)0.1%を含むM9培地200mlにH45株を接種し、30℃、125ストローク/分で振盪培養した。24時間後、菌体を遠心分離によって回収し、冷メタノールで一度洗浄して凍結乾燥し、秤量した。

【0326】この凍結乾燥ペレットを100mlのアセトンに懸濁し、室温(23℃)で72時間攪拌してポリマーを抽出した。抽出液を孔径0.45μmのメンブレンフィルターでろ過したのち、ロータリーエバポレーターで濃縮し、濃縮液を冷メタノール中で再沈殿させ、更に沈殿のみを回収して真空乾燥してポリマーを得、これ

を秤量した。

【0327】得られたポリマーの分子量は、ゲルパーミエーションクロマトグラフィー(GPC;東ソー・HLC-8020、カラム:ポリマーラボラトリー・PLGel-MIXED-C・5μm、溶媒:クロロホルム、ポリスチレン換算分子量)により測定した。

【0328】得られたポリマーのユニット組成は以下のようにして分析した。即ち、ポリマーサンプル5mgを25ml容ナス型フラスコに入れ、クロロホルム2ml及び硫酸を3%(v/v)含むメタノール2mlを加えて100℃で3.5時間還流し、更に水を加えて分液した後、有機層をガスクロマトグラフィー質量分析装置(GC-MS、島津QP-5050、カラム:DB-WAXETR(J&W社製)、EI法)で分析し、PHAモノマーユニットのメチルエステル化物の同定を行っ

(49) 101-288256 (P2001-288256A)

た。菌体及びポリマーの収率、モノマーユニットの分析結果を表35に示す。また、GC-MS測定より得られた、3-ヒドロキシ-4-フェノキシ酪酸(3HPxB)メチルエステル、3-ヒドロキシ-6-フェノキシヘキサン酸(3HPxHx)メチルエステル、3-ヒドロキシ-8-フェノキシオクタン酸(3HPxO)メチルエステルのマススペクトルを図25、図26及び図27に示す。

【0329】この結果から、H45株により、8-フェ

ノキシオクタン酸を基質として3-ヒドロキシ-4-フェノキシ酪酸(3HPxB)3-ヒドロキシ-6-フェノキシヘキサン酸(3HPxHx)及び3-ヒドロキシ-8-フェノキシオクタン酸(3HPxO)の3ユニットのみからなるPHAコポリマーを生産し得ることが示された。

【0330】

【表35】

菌体乾燥重量 (mg/L)	980
ポリマー乾燥重量 (mg/L)	225
数平均分子量 (Mn) × 10 <sup>4</sup>	1.8
重平均分子量 (Mw) × 10 <sup>4</sup>	4.3
3-ヒドロキシ-4-フェノキシ酪酸 (%)	2.4
3-ヒドロキシ-6-フェノキシヘキサン酸 (%)	73.2
3-ヒドロキシ-8-フェノキシオクタン酸 (%)	24.4

【0331】I：本発明のポリヒドロキシアルカノエートの製造方法を、11-フェノキシウンデカン酸(PxUDA)を原料とする、3-ヒドロキシ-5-フェノキシ吉草酸(3HPxV)、3-ヒドロキシ-7-フェノキシヘプタン酸(3HPxHp)、3-ヒドロキシ-9-フェノキシノナン酸(3HPxN)の三種に由来するモノマーユニットからなるポリヒドロキシアルカノエート：3-ヒドロキシ-5-フェノキシ吉草酸(3HPxV)、3-ヒドロキシ-7-フェノキシヘプタン酸(3HPxHp)ならびに3-ヒドロキシ-9-フェノキシノナン酸(3HPxN)からなるコポリマーの製造に適用した一例を示す。

【0332】(実施例I-1) YN2株によるP(HPxN/HPxHp/HPxV)ポリマーの生産(酵母エキス-段階培養)

酵母エキス(Difco社製)0.5%、11-フェノキシウンデカン酸(PxUDA)0.1%を含むM9培地200mlにYN2株を接種し、30℃、125ストローク/分で振盪培養した。64時間後、菌体を遠心分離によって回収し、冷メタノールで一度洗浄して凍結乾燥し、秤量した。

【0333】この凍結乾燥ペレットを100mlのアセトンに懸濁し、室温(23℃)で72時間攪拌してポリマーを抽出した。抽出液を孔径0.45μmのメンブレンフィルターでろ過したのち、ロータリーエバポレーターで濃縮し、濃縮液を冷メタノール中で再沈殿させ、更に沈殿液を回収して真空乾燥してポリマーを得、これを秤量した。

【0334】得られたポリマーの分子量は、ゲルパーミエーションクロマトグラフィー(GPC;東ソー・HL

C-8020、カラム;ポリマーラボラトリー・PLGel・MIXED-C・5μm、溶媒;クロロホルム、ポリスチレン換算分子量)により測定した。

【0335】得られたポリマーのユニット組成は以下のようにして分析した。即ち、ポリマーサンプル5mgを25ml容ナス型フラスコに入れ、クロロホルム2ml及び硫酸を3%(v/v)含むメタノール2mlを加えて100℃で3.5時間還流し、更に水を加えて分液した後、有機層をガスクロマトグラフィー-質量分析装置(GC-MS、島津QP-5050、カラム:DB-WAXETR(J&W社製)、EI法)で分析し、PHAモノマーユニットのメチルエステル化物の同定を行った。菌体及びポリマーの収率、モノマーユニットの分析結果を表36に示す。また、GC-MS測定より得られた、3-ヒドロキシ-5-フェノキシ吉草酸(3HPxV)メチルエステル、3-ヒドロキシ-7-フェノキシヘプタン酸(3HPxHp)メチルエステル及び3-ヒドロキシ-9-フェノキシノナン酸(3HPxN)メチルエステルのマススペクトルを図28、図29及び図30に示す。

【0336】この結果から、YN2株により、11-フェノキシウンデカン酸を基質として3-ヒドロキシ-5-フェノキシ吉草酸(3HPxV)、3-ヒドロキシ-7-フェノキシヘプタン酸(3HPxHp)及び3-ヒドロキシ-9-フェノキシノナン酸(3HPxN)の3つのユニットのみからなるPHAコポリマーを生産し得ることが示された。

【0337】

【表36】



(50) 01-288256 (P2001-288256A)

菌体乾燥重量 (mg/L)	1510
ポリマー乾燥重量 (mg/L)	385
数平均分子量 (Mn) $\times 10^4$	1.8
重量平均分子量 (Mw) $\times 10^4$	3.8
3-ヒドロキシ-5-フェノキシ吉草酸 (%)	32.0
3-ヒドロキシ-7-フェノキシヘプタン酸 (%)	65.6
3-ヒドロキシ-9-フェノキシノナン酸 (%)	2.4

【0338】(実施例I-2) H45株によるP(H P $\times$ N/H P $\times$ H P/H P $\times$ V)ポリマーの生産(酵母エキス段階培養)

酵母エキス(Difco社製)0.5%、11-フェノキシウンデカン酸(P $\times$ UDA)0.1%とを含むM9培地200mlにH45株を接種し、30℃、125ストローク/分で振盪培養した。64時間後、菌体を遠心分離によって回収し、冷メタノールで一度洗浄して凍結乾燥し、秤量した。

【0339】この凍結乾燥ペレットを100mlのアセトンに懸濁し、室温(23℃)で72時間攪拌してポリマーを抽出した。抽出液を孔径0.45 $\mu$ mのメンブレンフィルターでろ過したのち、ロータリーエバポレーターで濃縮し、濃縮液を冷メタノール中で再沈殿させ、更に沈殿のみを回収して真空乾燥してポリマーを得、これを秤量した。

【0340】得られたポリマーの分子量は、ゲルパーミエーションクロマトグラフィー(GPC; 東ソー・HLC-8020、カラム: ポリマーラボラトリー・PL gel-M $\times$ ED-C $\cdot$ 5 $\mu$ m、溶媒: クロロホルム、ポリスチレン換算分子量)により測定した。

【0341】得られたポリマーのユニット組成は以下のようにして分析した。即ち、ポリマーサンプル5mgを25ml容ナス型フラスコに入れ、クロロホルム2ml

及び硫酸を3%(v/v)含むメタノール2mlを加えて100℃で3.5時間還流し、更に水を加えて分液した後、有機層をガスクロマトグラフィー質量分析装置(GC-MS、島津QP-5050、カラム: DB-WAXETR(J&W社製)、EI法)で分析し、PHAMonomerユニットのメチルエステル化物の同定を行った。菌体及びポリマーの収率、モノマーユニットの分析結果を表37に示す。また、GC-MS測定より得られた、3-ヒドロキシ-5-フェノキシ吉草酸(3HP $\times$ V)メチルエステル、3-ヒドロキシ-7-フェノキシヘプタン酸(3HP $\times$ HP)メチルエステル及び3-ヒドロキシ-9-フェノキシノナン酸(3HP $\times$ N)メチルエステルのマススペクトルを図31、図32及び図33に示す。

【0342】この結果から、H45株により、11-フェノキシウンデカン酸を基質として3-ヒドロキシ-5-フェノキシ吉草酸(3HP $\times$ V)、3-ヒドロキシ-7-フェノキシヘプタン酸(3HP $\times$ HP)及び3-ヒドロキシ-9-フェノキシノナン酸(3HP $\times$ N)の3つのユニットのみからなるPHAコポリマーを生産し得ることが示された。

【0343】

【表37】

菌体乾燥重量 (mg/L)	1015
ポリマー乾燥重量 (mg/L)	120
数平均分子量 (Mn) $\times 10^4$	2.2
重量平均分子量 (Mw) $\times 10^4$	4.5
3-ヒドロキシ-5-フェノキシ吉草酸 (%)	45.8
3-ヒドロキシ-7-フェノキシヘプタン酸 (%)	47.8
3-ヒドロキシ-9-フェノキシノナン酸 (%)	6.4

【0344】J: 本発明のポリヒドロキシアルカノエートの製造方法を、6-フェニルヘキサン酸(PH $\times$ A)を原料とする、3-ヒドロキシ-6-フェニルヘキサン酸(3HP $\times$ Hx)に由来するモノマーユニットからなる

ポリヒドロキシアルカノエート: ポリ-3-ヒドロキシ-6-フェニルヘキサン酸(3HPH $\times$ )の製造、あるいは、3-ヒドロキシ-6-フェニルヘキサン酸(3HPH $\times$ )と3-ヒドロキシ-4-フェニル酪酸(3HP

(51) 01-288256 (P2001-288256A)

B) に由来するモノマーユニットからなるポリヒドロキシアルカンエート：3-ヒドロキシ-6-フェニルヘキサン酸 (3HPHx) と 3-ヒドロキシ-4-フェニル酪酸 (3HPB) からなるコポリマーの製造に適用した一例を示す。

【0345】(実施例 J-1) YN2 株による PHPHx ポリマーの生産 (酵母エキス段階培養)

酵母エキス (Difco 社製) 0.5%、6-フェニルヘキサン酸 (PHxA) 0.1% とを含む M9 培地 200 ml に YN2 株を接種し、30℃、125 ストローク/分で振盪培養した。27 時間後、菌体を遠心分離によって回収し、冷メタノールで一度洗浄して凍結乾燥し、秤量した。

【0346】この凍結乾燥ペレットを 100 ml のアセトンに懸濁し、室温 (23℃) で 72 時間攪拌してポリマーを抽出した。抽出液を孔径 0.45  $\mu$ m のメンブレンフィルターでろ過したのち、ロータリーエバポレーターで濃縮し、濃縮液を冷メタノール中で再沈殿させ、更に沈殿のみを回収して真空乾燥してポリマーを得、これを秤量した。

【0347】得られたポリマーの分子量は、ゲルパーミエーションクロマトグラフィー (GPC; 東ソー・HLC-8020、カラム; ポリマーラボラトリー・PLg

el・MIXED-C・5  $\mu$ m、溶媒; クロロホルム、ポリスチレン換算分子量) により測定した。

【0348】得られたポリマーのユニット組成は以下のようにして分析した。即ち、ポリマーサンプル 5 mg を 25 ml 容ナス型フラスコに入れ、クロロホルム 2 ml 及び硫酸を 3% (v/v) 含むメタノール 2 ml を加えて 100℃ で 3.5 時間還流し、更に水を加えて分液した後、有機層をガスクロマトグラフィー質量分析装置 (GC-MS、島津 QP-5050、カラム: DB-WAXETR (J&W 社製)、EI 法) で分析し、PHA モノマーユニットのメチルエステル化物の同定を行った。菌体及びポリマーの収率、モノマーユニットの分析結果を表 38 に示す。また、GC-MS 測定より得られた、3-ヒドロキシ-6-フェニルヘキサン酸 (3HPHx) メチルエステルのマススペクトルを図 34 に示す。

【0349】この結果から、YN2 株により、6-フェニルヘキサン酸を基質として 3-ヒドロキシ-6-フェニルヘキサン酸 (3HPHx) のみからなる PHA ポリマーを生産し得ることが示された。

【0350】

【表 38】

菌体乾燥重量 (mg/L)	109.5
ポリマー乾燥重量 (mg/L)	9.0
数平均分子量 ( $M_n$ ) $\times 10^4$	6.8
重量平均分子量 ( $M_w$ ) $\times 10^4$	17.9
3-ヒドロキシ-6-フェニルヘキサン酸 (%)	100.0

【0351】(実施例 J-2) H45 株による P (HPHx/HPB) ポリマーの生産 (酵母エキス段階培養)

酵母エキス (Difco 社製) 0.5%、6-フェニルヘキサン酸 (PHxA) 0.1% とを含む M9 培地 200 ml に H45 株を接種し、30℃、125 ストローク/分で振盪培養した。27 時間後、菌体を遠心分離によって回収し、冷メタノールで一度洗浄して凍結乾燥し、秤量した。

【0352】この凍結乾燥ペレットを 100 ml のアセトンに懸濁し、室温 (23℃) で 72 時間攪拌してポリマーを抽出した。抽出液を孔径 0.45  $\mu$ m のメンブレンフィルターでろ過したのち、ロータリーエバポレーターで濃縮し、濃縮液を冷メタノール中で再沈殿させ、更に沈殿のみを回収して真空乾燥してポリマーを得、これを秤量した。

【0353】得られたポリマーの分子量は、ゲルパーミエーションクロマトグラフィー (GPC; 東ソー・HLC

C-8020、カラム; ポリマーラボラトリー・PLg el・MIXED-C・5  $\mu$ m、溶媒; クロロホルム、ポリスチレン換算分子量) により測定した。

【0354】得られたポリマーのユニット組成は以下のようにして分析した。即ち、ポリマーサンプル 5 mg を 25 ml 容ナス型フラスコに入れ、クロロホルム 2 ml 及び硫酸を 3% (v/v) 含むメタノール 2 ml を加えて 100℃ で 3.5 時間還流し、更に水を加えて分液した後、有機層をガスクロマトグラフィー質量分析装置 (GC-MS、島津 QP-5050、カラム: DB-WAXETR (J&W 社製)、EI 法) で分析し、PHA モノマーユニットのメチルエステル化物の同定を行った。菌体及びポリマーの収率、モノマーユニットの分析結果を表 39 に示す。また、GC-MS 測定より得られた、3-ヒドロキシ-4-フェニル酪酸 (3HPB) メチルエステル及び 3-ヒドロキシ-6-フェニルヘキサン酸 (3HPHx) メチルエステルのマススペクトルを図 35 及び図 36 に示す。

(52) 01-288256 (P2001-288256A)

【0355】この結果から、H45株により、6-フェニルヘキサン酸を基質として、3-ヒドロキシ-4-フェニル酪酸(3HPB)と3-ヒドロキシ-6-フェニルヘキサン酸(3HPHX)のみからなるPHAコポリ

マーを生産し得ることが示された。

【0356】

【表39】

菌体乾燥重量 (mg/L)	98.6
ポリマー乾燥重量 (mg/L)	9.0
数平均分子量 (Mn) $\times 10^4$	6.9
重量平均分子量 (Mw) $\times 10^4$	15.5
3-ヒドロキシ-4-フェニル酪酸 (%)	1.7
3-ヒドロキシ-6-フェニルヘキサン酸 (%)	98.7

【0357】K: 本発明のポリヒドロキシアルカノエートの製造方法を、5-フェニル吉草酸(PVA)及び5-フェノキシ吉草酸(PxVA)の二種を原料とする、対応する3-ヒドロキシ-5-フェニル吉草酸(3HPV)と3-ヒドロキシ-5-フェノキシ吉草酸(3HPxV)に由来するモノマーユニットからなるポリヒドロキシアルカノエート: 3-ヒドロキシ-5-フェニル吉草酸(3HPV)と3-ヒドロキシ-5-フェノキシ吉草酸(3HPxV)からなるコポリマーの製造に適用した一例を示す。

【0358】(実施例K-1) YN2株によるP(HPV/HPxV)ポリマーの生産(酵母エキス段階培養)

酵母エキス(Difco社製)0.5%、5-フェニル吉草酸(PVA)0.05%及び5-フェノキシ吉草酸(PxVA)0.05%とを含むM9培地200mlにYN2株を接種し、30℃、125ストローク/分で振盪培養した。24時間後、菌体を遠心分離によって回収し、冷メタノールで一度洗浄して凍結乾燥し、秤量した。

【0359】この凍結乾燥ペレットを100mlのアセトンに懸濁し、室温(23℃)で72時間攪拌してポリマーを抽出した。抽出液を孔径0.45 $\mu$ mのメンブレンフィルターでろ過したのち、ロータリーエバポレーターで濃縮し、濃縮液を冷メタノール中で再沈殿させ、更に沈殿のみを回収して真空乾燥してポリマーを得、これを秤量した。

【0360】得られたポリマーの分子量は、ゲルパーミ

エーションクロマトグラフィー(GPC; 東ソー・HLC-8020、カラム; ポリマーラボラトリー・PLGel 1-MIXED-C-5 $\mu$ m、溶媒; クロロホルム、ポリスチレン換算分子量)により測定した。

【0361】得られたポリマーのユニット組成は以下のようにして分析した。即ち、ポリマーサンプル5mgを25ml容ナス型フラスコに入れ、クロロホルム2ml及び硫酸を3%(v/v)含むメタノール2mlを加えて100℃で3.5時間還流し、更に水を加えて分液した後、有機層をガスクロマトグラフィー質量分析装置(GC-MS、島津QP-5050、カラム: DB-WAXETR(J&W社製)、EI法)で分析し、PHAMonomerユニットのメチルエステル化物の同定を行った。菌体及びポリマーの収率、モノマーユニットの分析結果を表40に示す。また、GC-MS測定より得られた、3-ヒドロキシ-5-フェニル吉草酸(3HPV)メチルエステル及び3-ヒドロキシ-5-フェノキシ吉草酸(3HPxV)メチルエステルのマススペクトルを図37及び図38に示す。

【0362】この結果から、YN2株により、5-フェニル吉草酸及び5-フェノキシ吉草酸を基質として、対応する3-ヒドロキシ-5-フェニル吉草酸(3HPV)と3-ヒドロキシ-5-フェノキシ吉草酸(3HPxV)のみからなるPHAコポリマーを生産し得ることが示された。

【0363】

【表40】

(53) 101-288256 (P2001-288256A)

菌体乾燥重量 (mg/L)	1300
ポリマー乾燥重量 (mg/L)	330
数平均分子量 (Mn) $\times 10^4$	5.0
重量平均分子量 (Mw) $\times 10^4$	10.8
3-ヒドロキシ-5-フェニル吉草酸 (%)	62.3
3-ヒドロキシ-5-フェノキシ吉草酸 (%)	37.7

【0364】(実施例K-2) H45株によるP(HPV/HPxV)ポリマーの生産(酵母エキス段階培養)

酵母エキス(Difco社製)0.5%、5-フェニル吉草酸(PVA)0.05%及び5-フェノキシ吉草酸(PxVA)0.05%とを含むM9培地200mlにH45株を接種し、30℃、125ストローク/分で振盪培養した。24時間後、菌体を遠心分離によって回収し、冷メタノールで一度洗浄して凍結乾燥し、秤量した。

【0365】この凍結乾燥ペレットを100mlのアセトンに懸濁し、室温(23℃)で72時間攪拌してポリマーを抽出した。抽出液を孔径0.45 $\mu$ mのメンブレンフィルターでろ過したのち、ロータリーエバポレーターで濃縮し、濃縮液を冷メタノール中で再沈殿させ、更に沈殿のみを回収して真空乾燥してポリマーを得、これを秤量した。

【0366】得られたポリマーの分子量は、ゲルパーミエーションクロマトグラフィー(GPC; 東ソー・HLC-8020、カラム; ポリマーラボラトリー・PL gel-MIXED-C-5 $\mu$ m、溶媒; クロロホルム、ポリスチレン換算分子量)により測定した。

【0367】得られたポリマーのユニット組成は以下の

菌体乾燥重量 (mg/L)	1050
ポリマー乾燥重量 (mg/L)	165
数平均分子量 (Mn) $\times 10^4$	3.6
重量平均分子量 (Mw) $\times 10^4$	7.7
3-ヒドロキシ-5-フェニル吉草酸 (%)	76.4
3-ヒドロキシ-5-フェノキシ吉草酸 (%)	23.6

【0370】

【発明の効果】本発明により、微生物を用いて、鎖の末端に、置換または未置換フェニル基、置換または未置換フェノキシ基、置換または未置換シクロヘキシル基の何れかの6員環原子団が置換されている、 $\omega$ -置換-直鎖アルカン酸を原料として、対応する $\omega$ -置換-3-ヒド

ロキシアルカン酸をモノマーユニットとして含むポリヒドロキシアルカノエートを製造する方法、これら側鎖の末端に6員環原子団を有するポリヒドロキシアルカノエートの選択的な製造に好適な微生物が提供される。本発明の製造方法により、初めて微生物産生が可能となった種々のポリヒドロキシアルカノエートは、酵母エキスを

【0368】この結果から、H45株により、5-フェニル吉草酸及び5-フェノキシ吉草酸を基質として、対応する3-ヒドロキシ-5-フェニル吉草酸(3HPV)と3-ヒドロキシ-5-フェノキシ吉草酸(3HPxV)のみからなるPHAコポリマーを生産し得ることが示された。

【0369】

【表41】

ロキシアルカン酸をモノマーユニットとして含むポリヒドロキシアルカノエートを製造する方法、これら側鎖の末端に6員環原子団を有するポリヒドロキシアルカノエートの選択的な製造に好適な微生物が提供される。本発明の製造方法により、初めて微生物産生が可能となった種々のポリヒドロキシアルカノエートは、酵母エキスを

(ち4) 01-288256 (P2001-288256A)

と原料の $\omega$ -置換-直鎖アルカン酸を含む無機培地において、例えば、シュドモナス属 (*Pseudomonas* sp.) に属する微生物を培養して、原料の $\omega$ -置換-直鎖アルカン酸に作用させることで効率的に製造できるので、生分解性を持つ、機能性ポリマーとして有用

なポリヒドロキシアルカノエートとして、デバイス材料や医用材料等の各分野への応用が期待できる。

【0371】

【配列表】

## SEQUENCE LISTING

&lt;110&gt; CANON INC.

&lt;120&gt; Preparation of Poly-hydroxyalkanoic Acid

&lt;130&gt; 4351008

&lt;160&gt; 1

&lt;170&gt; Microsoft Word

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 1501

&lt;212&gt; DNA

<213> *Pseudomonas jessenii* P161 ; FERM P-17445

&lt;400&gt; 1

```

tgaacgtg cgccagcct aacacatgca agtcagcgg 40
atgacgggag cttgctcctg aattcagcgg cggacgggtg 80
agtaatgcct aggaatctgc ctggtagtgg gggacaacgt 120
ctcgaagggg acgctaatac cgcatacgtc ctacgggaga 160
aagcagggga ccttcgggcc ttgcgtatc agatgagcct 200
agstcggatt agctagtggg tgaggtaatg gtcaccaag 240
gcgacgatcc gtaactggtc tgagaggatg atcagtcaca 280
ctggaactga gacacgggcc agactcctac gggaggcagc 320
agtggggaat attggacaat gggcgaagc ctgatccagc 360
catgccgcgt gtgtgaagaa ggtcttcgga ttgtaaagca 400
ctttaagltg gggaggaagg cattaaccta atacgttagt 440
gtttgacgt taccgacaga ataagcacgc gctaactctg 480
tgccagcagc cgcggttaata cagagggtgc aagcgttaat 520
cggaattact gggcgtaaag cgcgcgtagg tggttgtta 560
agttggatgt gaaagccccg ggctcaacct gggaaactgca 600
ttcaaaactg acaagctaga gtatggtaga gggtagtgga 640
atltcctgtg tagcgtgaa atgcgtagat ataggaagga 680
acaccagtgg cgaaggcgac caccgtgact gatactgaca 720
ctgaggtgcg aaagcgtggg gagcaaacag gattagatac 760
cctggtagtc cagcccgtaa acgatgtcaa ctagccgttg 800
ggagccttga gctcttagtg gcgcagctaa cgcattaagt 840
tgaccgcctg gggagtacgg ccgcaagggtt anaactcaaa 880
tgaattgacg ggggcccgca caagcgtggg agcatgtggt 920
ttaattcgaa gcaacgcgaa gaaccttacc aggccttgac 960
atccaatgaa ctttcagag atggatgggt gccttcggga 1000
acattgagac aggtgctgca tggctgtcgt cagctcgtgt 1040
cgtgagatgt tgggttaagt cccgtaacga gcgcaacct 1080
tgtccttagt taccagcacg taatggtggg cactctaagg 1120
agactccggg tgacaaaccg gaggaaggtg ggaatgacgt 1160
caagtcatca tggcccttac ggctgggct acacacgtgc 1200
tacaatggtc ggtacagagg gttccaagc cgcgaggtgg 1240
agctaatecc acaaaaccga tcgtagtccg galcgcagtc 1280
tgcaactcga ctgcgtgaag tcggaatcgc tagtaatcgc 1320
gaatcagaat gtcgcgtga atacgttccc gggccttcta 1360

```

(55) 01-288256 (P2001-288256A)

```

cacaccgcc gtcacacat gggagtgggt tgcaccagaa 1400
gtagctagtc taaccttcgg gaggacggtt accacggtgt 1440
gattcatgac tggsgtgnag tegtaccaag gtagccgtag 1480
gggaacctgc ggctggatca c 1501

```

## 【図面の簡単な説明】

- 【図1】実施例A-2で得られた、P91株の培養菌体から回収したPHAの<sup>1</sup>H-NMRスペクトルを示す。
- 【図2】実施例B-1で得られた5-フェノキシ吉草酸に関する核磁気共鳴スペクトルの測定結果を示す図である。
- 【図3】実施例B-2で得られたPHAを構成するモノマーユニットのメチルエステル化物についての分析結果を示す図であり、(a)はGC-MSのトータルイオンクロマトグラフィー(TIC)を、(b)はTICでのメインピークのマスマスペクトルを示す。
- 【図4】実施例B-2で得られたPHAに関する核磁気共鳴スペクトルの測定結果を示す図である。
- 【図5】実施例B-3で得られたPHAを構成するモノマーユニットのメチルエステル化物の分析結果を示す図であり、(a)はTICであり、(b)はTICでのメインピークのマスマスペクトルである。
- 【図6】実施例C-1で得られた5-(4-フルオロフェノキシ)吉草酸に関する核磁気共鳴スペクトルの測定結果を示す図である。
- 【図7】実施例C-2で得られたPHAを構成するモノマーユニットのメチルエステル化物についての分析結果を示す図であり、(a)はGC-MSのトータルイオンクロマトグラフィー(TIC)を、(b)はTICでのメインピークのマスマスペクトルを示す。
- 【図8】実施例C-2で得られたPHAに関する核磁気共鳴スペクトルの測定結果を示す図である。
- 【図9】実施例C-3で得られたPHAを構成するモノマーユニットのメチルエステル化物における分析結果を示す図であり、(a)はTICであり、(b)TICでのメインピークのマスマスペクトルである。
- 【図10】実施例D-5における、H45株により産生されたポリ-3-ヒドロキシ-5-フェニル吉草酸の<sup>1</sup>H-NMRスペクトル測定結果を示す。
- 【図11】実施例D-5における、H45株により産生されたポリ-3-ヒドロキシ-5-フェニル吉草酸の<sup>13</sup>C-NMRスペクトル測定結果を示す。
- 【図12】シュードモナス ジェッセニイ P161株(Pseudomonas jessenii P161; FERM P-17445)の16S rRNAの塩基配列を示す。
- 【図13】実施例E-1において、原料アルカノエートとして合成した、FPVAの核磁気共鳴スペクトルの測定結果を示す図である。
- 【図14】実施例E-5において、FPVAを原料として、本発明の製造方法で得られたPHAの<sup>1</sup>H-NMRスペクトルのチャートである。

【図15】実施例E-5において、FPVAを原料として、本発明の製造方法で得られたPHAの<sup>13</sup>C-NMRスペクトルのチャートである。

【図16】実施例F-3で精製された、3-ヒドロキシ-4-シクロヘキシル酪酸ユニットからなるPHAの<sup>1</sup>H-NMRのチャートである。

【図17】実施例F-3で精製された、3-ヒドロキシ-4-シクロヘキシル酪酸ユニットからなるPHAの<sup>13</sup>C-NMRのチャートである。

【図18】実施例G-1で製造されたポリマーから、GC-MS測定より得られた、3-ヒドロキシ-5-フェノキシ吉草酸(3HPxV)メチルエステルのマスマスペクトルを示す。

【図19】実施例G-1で製造されたポリマーから、GC-MS測定より得られた、3-ヒドロキシ-7-フェノキシヘプタン酸(3HPxHp)メチルエステルのマスマスペクトルを示す。

【図20】実施例G-2で製造されたポリマーから、GC-MS測定より得られた、3-ヒドロキシ-5-フェノキシ吉草酸(3HPxV)メチルエステルのマスマスペクトルを示す。

【図21】実施例G-2で製造されたポリマーから、GC-MS測定より得られた、3-ヒドロキシ-7-フェノキシヘプタン酸(3HPxHp)メチルエステルのマスマスペクトルを示す。

【図22】実施例H-1で製造されたポリマーから、GC-MS測定より得られた、3-ヒドロキシ-4-フェノキシ酪酸(3HPxB)メチルエステルのマスマスペクトルを示す。

【図23】実施例H-1で製造されたポリマーから、GC-MS測定より得られた、3-ヒドロキシ-6-フェノキシヘキサン酸(3HPxHx)メチルエステルのマスマスペクトルを示す。

【図24】実施例H-1で製造されたポリマーから、GC-MS測定より得られた、3-ヒドロキシ-8-フェノキシオクタン酸(3HPxO)メチルエステルのマスマスペクトルを示す。

【図25】実施例H-2で製造されたポリマーから、GC-MS測定より得られた、3-ヒドロキシ-4-フェノキシ酪酸(3HPxB)メチルエステルのマスマスペクトルを示す。

【図26】実施例H-2で製造されたポリマーから、GC-MS測定より得られた、3-ヒドロキシ-6-フェノキシヘキサン酸(3HPxHx)メチルエステルのマスマスペクトルを示す。

【図27】実施例H-2で製造されたポリマーから、G

(56) 101-288256 (P2001-288256A)

C-MS測定より得られた、3-ヒドロキシ-8-フェノキシオクタン酸 (3HPxO) メチルエステルのマススペクトルを示す。

【図28】実施例I-1で製造されたポリマーから、GC-MS測定より得られた、3-ヒドロキシ-5-フェノキシオクタン酸 (3HPxV) メチルエステルのマススペクトルを示す。

【図29】実施例I-1で製造されたポリマーから、GC-MS測定より得られた、3-ヒドロキシ-7-フェノキシヘプタン酸 (3HPxHp) メチルエステルのマススペクトルを示す。

【図30】実施例I-1で製造されたポリマーから、GC-MS測定より得られた、3-ヒドロキシ-9-フェノキシノナン酸 (3HPxN) メチルエステルのマススペクトルを示す。

【図31】実施例I-2で製造されたポリマーから、GC-MS測定より得られた、3-ヒドロキシ-5-フェノキシ吉草酸 (3HPxV) メチルエステルのマススペクトルを示す。

【図32】実施例I-2で製造されたポリマーから、GC-MS測定より得られた、3-ヒドロキシ-7-フェノキシヘプタン酸 (3HPxHp) メチルエステルのマススペクトルを示す。

【図33】実施例I-2で製造されたポリマーから、GC-MS測定より得られた、3-ヒドロキシ-9-フェノキシノナン酸 (3HPxN) メチルエステルのマススペクトルを示す。

【図34】実施例J-1で製造されたポリマーから、GC-MS測定より得られた、3-ヒドロキシ-6-フェニルヘキサン酸 (3HPHx) メチルエステルのマススペクトルを示す。

C-MS測定より得られた、3-ヒドロキシ-6-フェニルヘキサン酸 (3HPHx) メチルエステルのマススペクトルを示す。

【図35】実施例J-2で製造されたポリマーから、GC-MS測定より得られた、3-ヒドロキシ-4-フェニル酪酸 (3HPB) メチルエステルのマススペクトルを示す。

【図36】実施例J-2で製造されたポリマーから、GC-MS測定より得られた、3-ヒドロキシ-6-フェニルヘキサン酸 (3HPHx) メチルエステルのマススペクトルを示す。

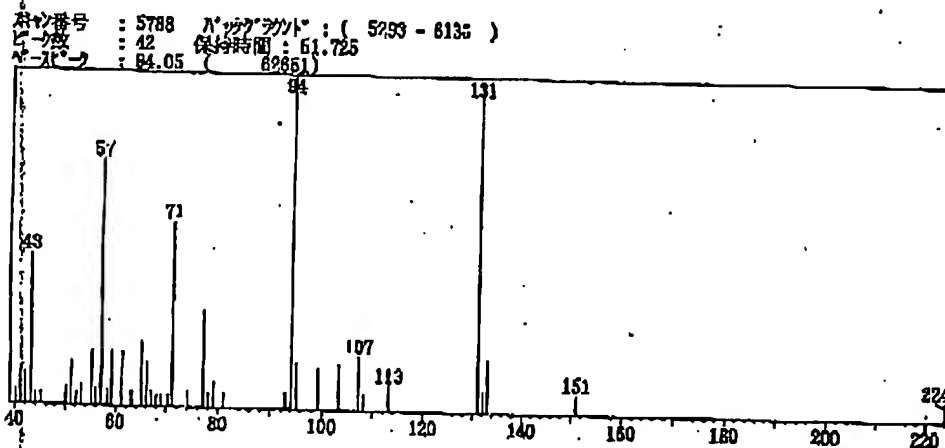
【図37】実施例K-1で製造されたポリマーから、GC-MS測定より得られた、3-ヒドロキシ-5-フェニル吉草酸 (3HPV) メチルエステルのマススペクトルを示す。

【図38】実施例K-1で製造されたポリマーから、GC-MS測定より得られた、3-ヒドロキシ-5-フェノキシ吉草酸 (3HPxV) メチルエステルのマススペクトルを示す。

【図39】実施例K-2で製造されたポリマーから、GC-MS測定より得られた、3-ヒドロキシ-5-フェニル吉草酸 (3HPV) メチルエステルのマススペクトルを示す。

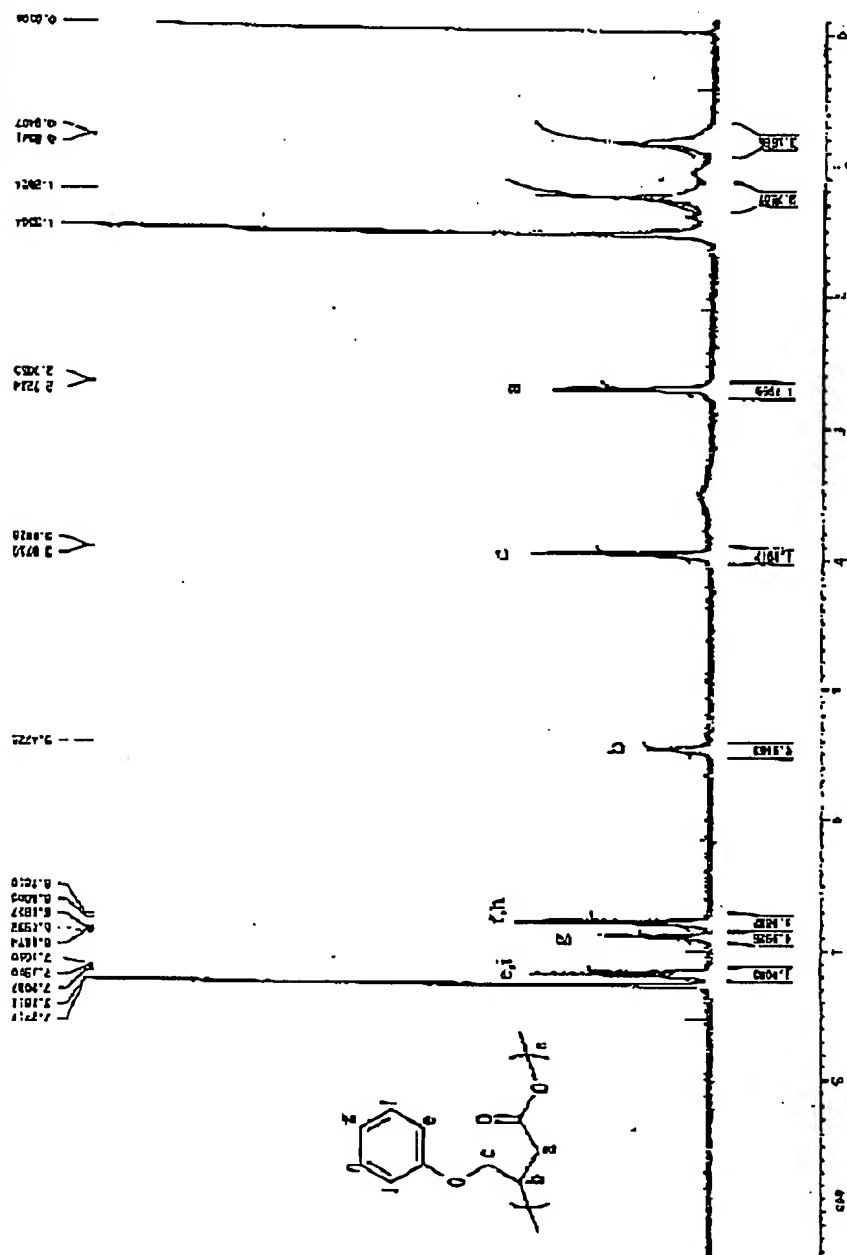
【図40】実施例K-2で製造されたポリマーから、GC-MS測定より得られた、3-ヒドロキシ-5-フェノキシ吉草酸 (3HPxV) メチルエステルのマススペクトルを示す。

【図18】



(57) 01-288256 (P2001-288256A)

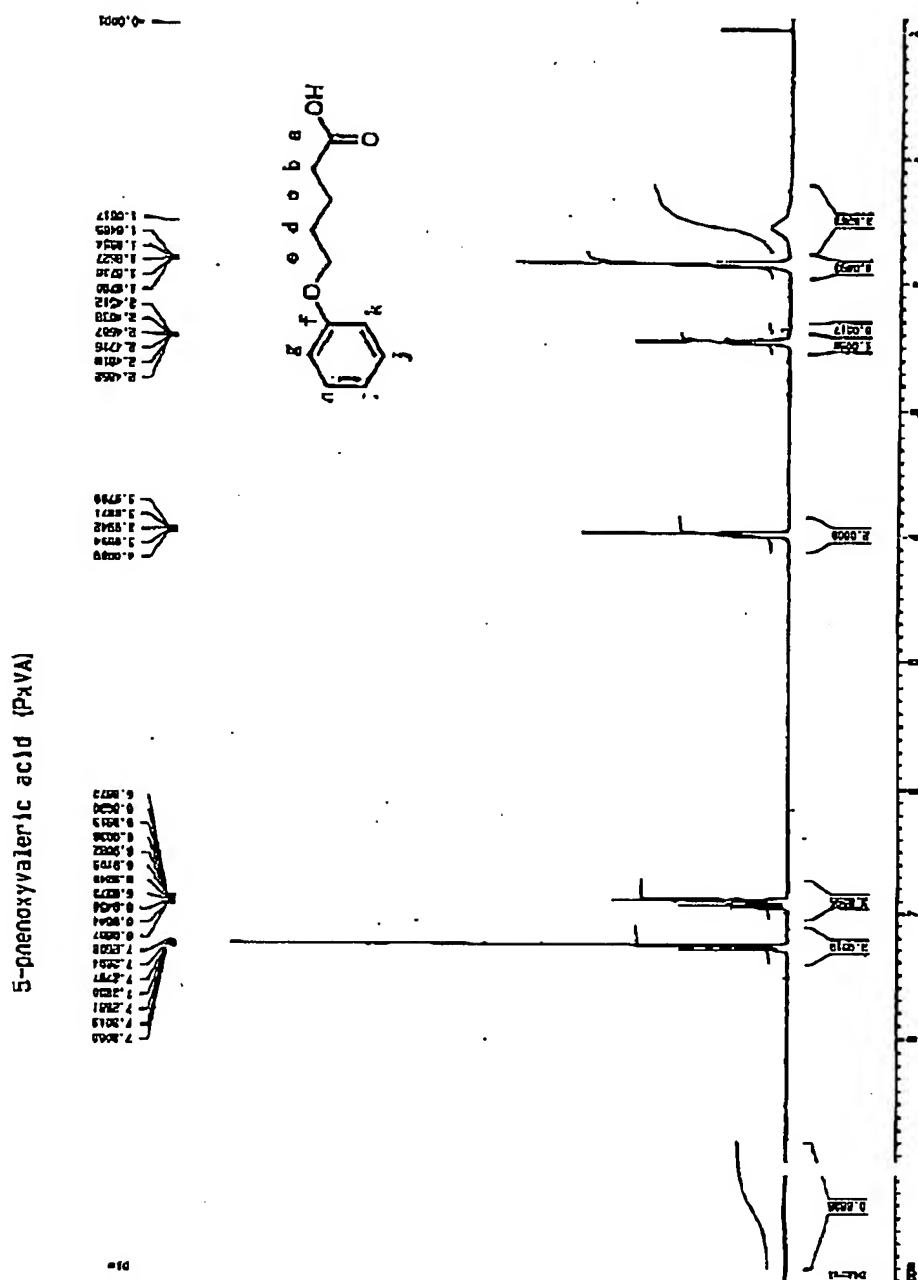
【图1】





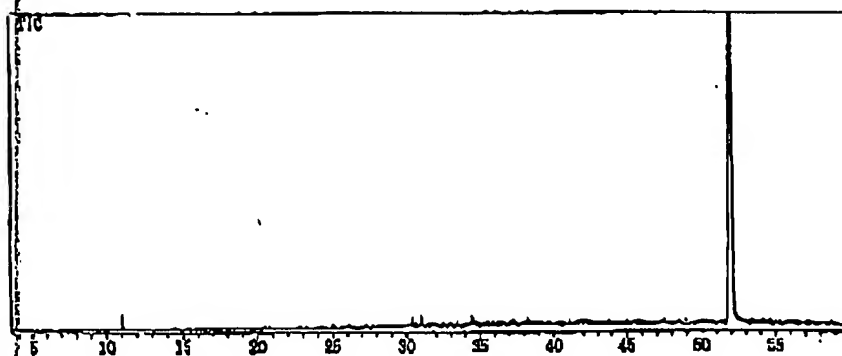
(58) 101-288256 (P2001-288256A)

【図2】

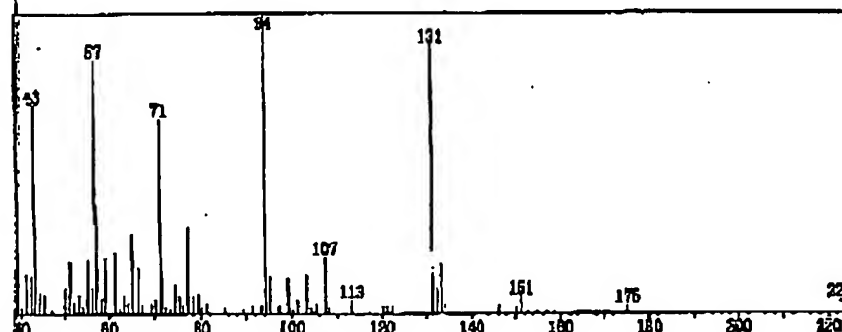


(59) 01-288256 (P2001-288256A)

【図3】



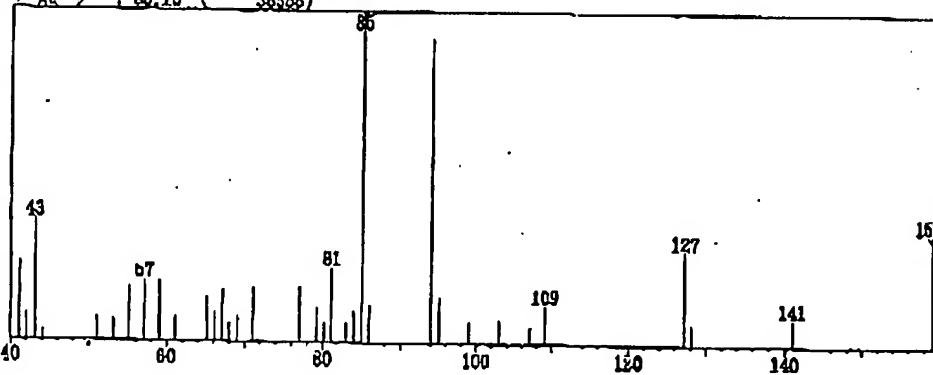
(a)



(b)

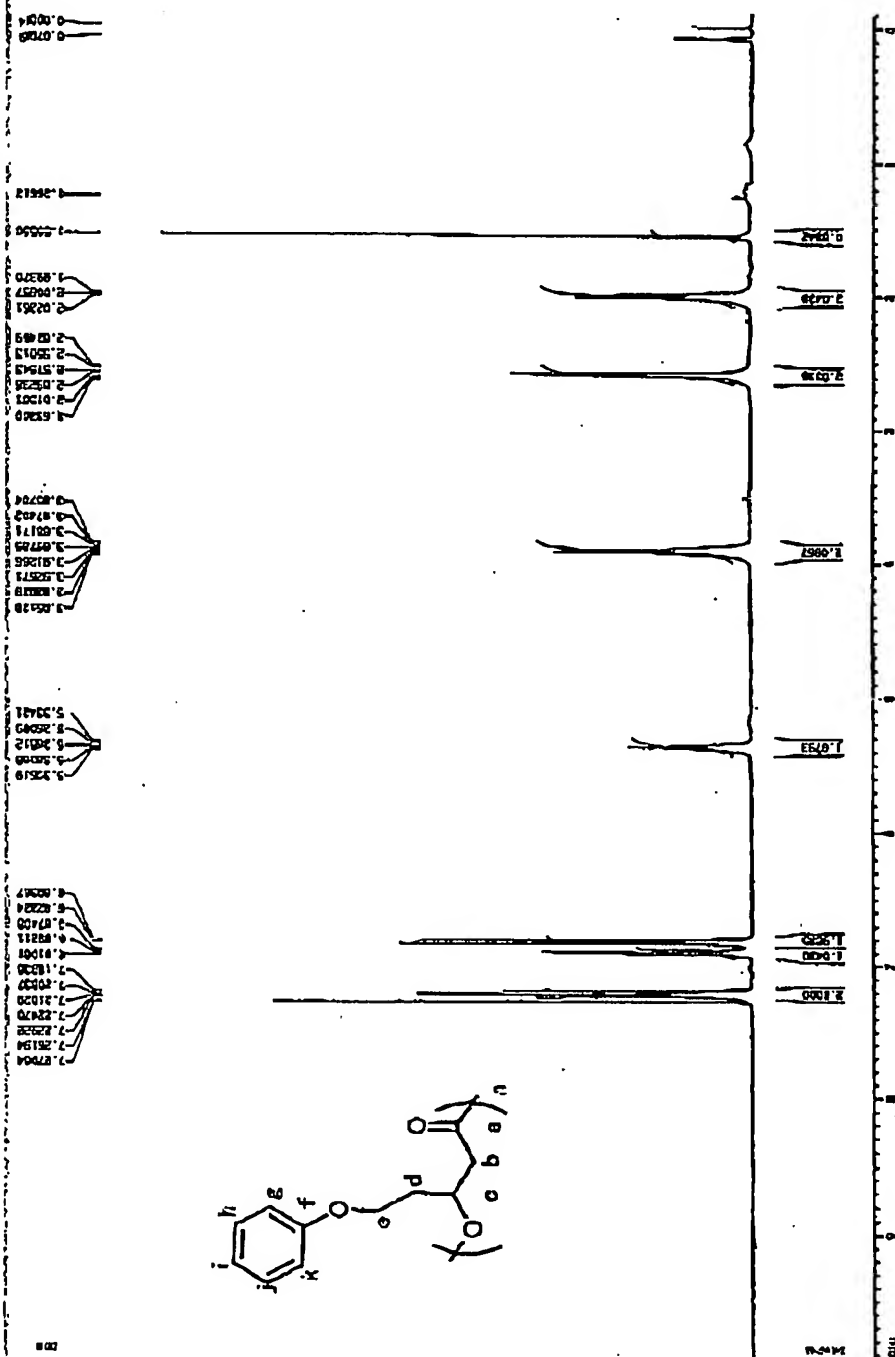
【図19】

サンプル番号 : 9336 分子量 : ( 8504 - 9732 )  
ピーク数 : 34 保持時間 : 81.292  
ピーク名 : 86.10 ( 38358 )



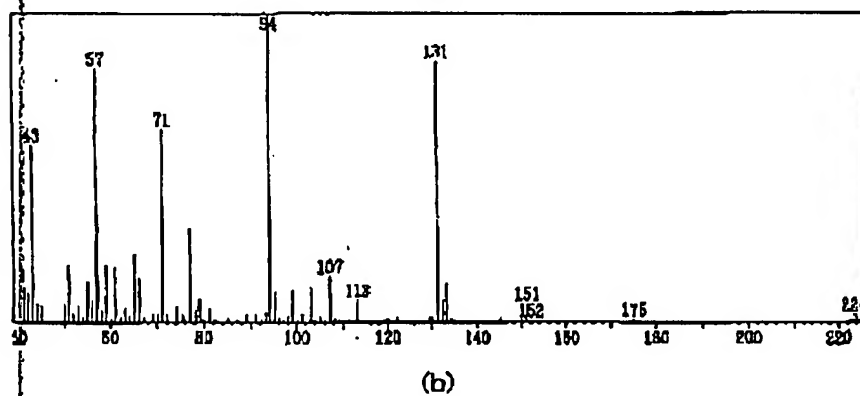
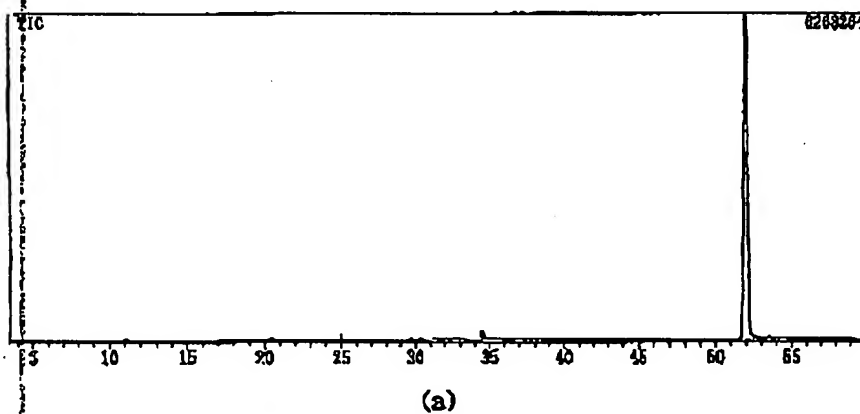
(50) 01-288256 (P2001-288256A)

【図4】



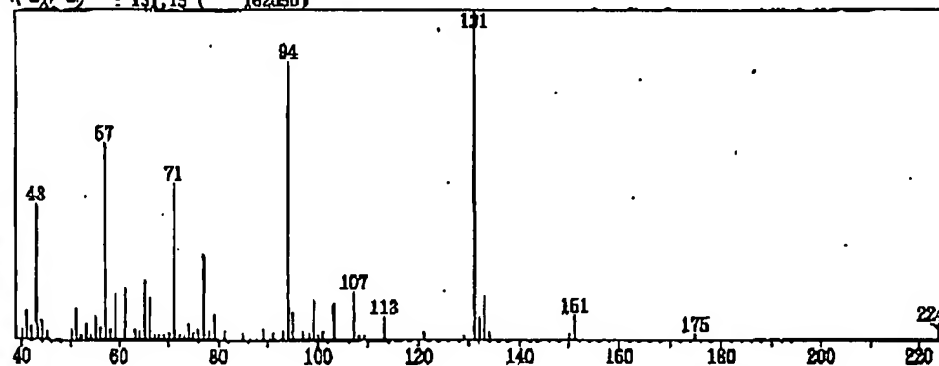
(51)01-288256 (P2001-288256A)

【図5】



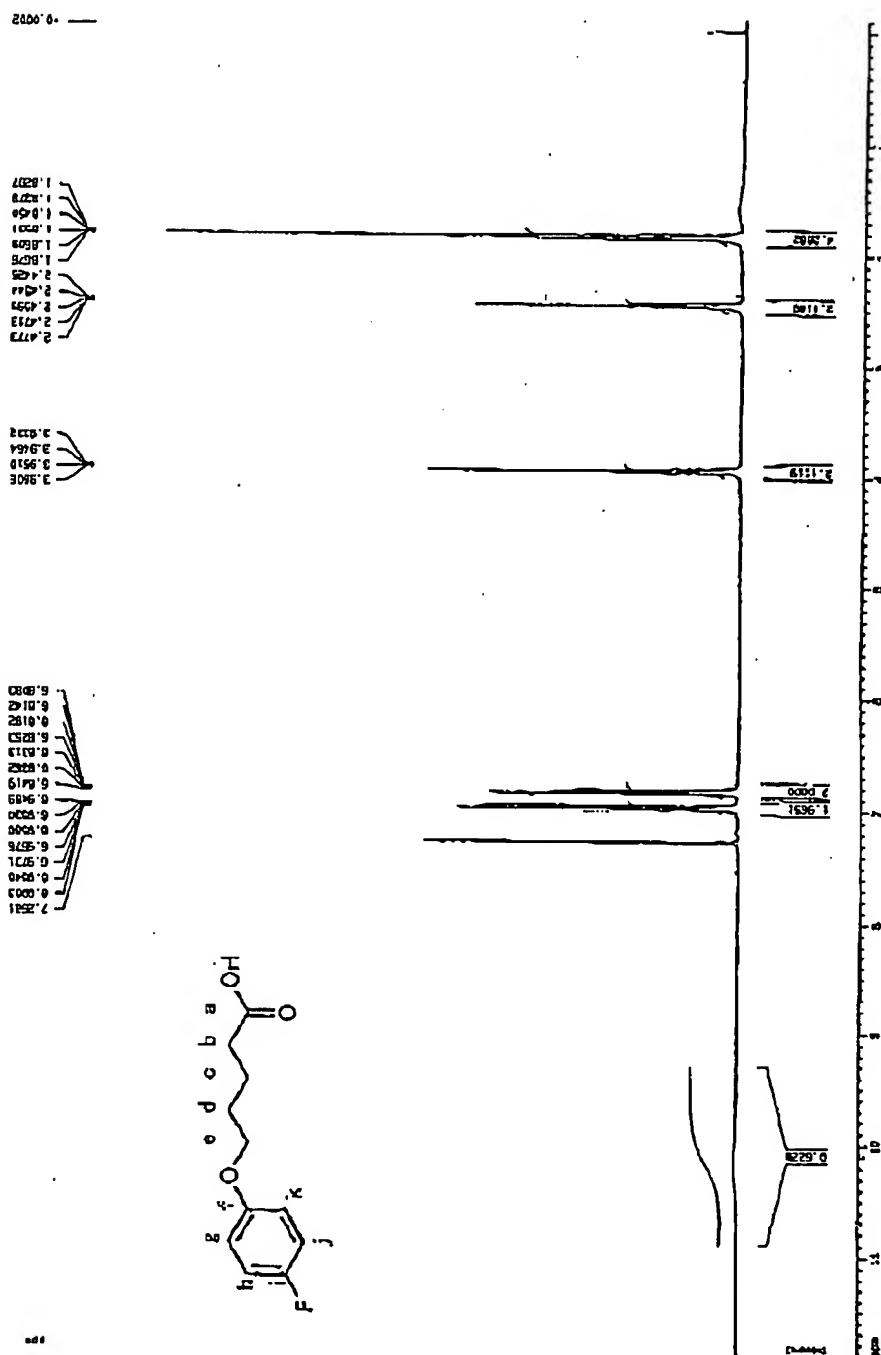
【図20】

検出番号 : 9780 - 検出時間 : ( 5377 - 6338 )  
ピーク : 61 保持時間 : 51.742  
ピーク : 131.15 ( 162050 )



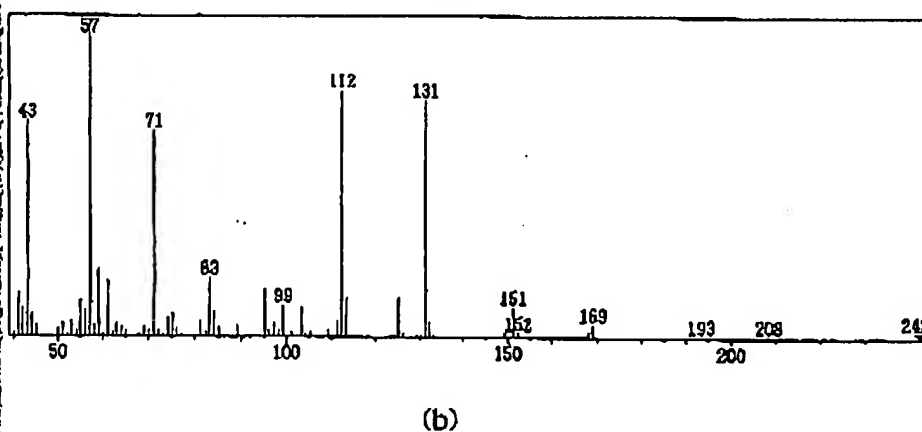
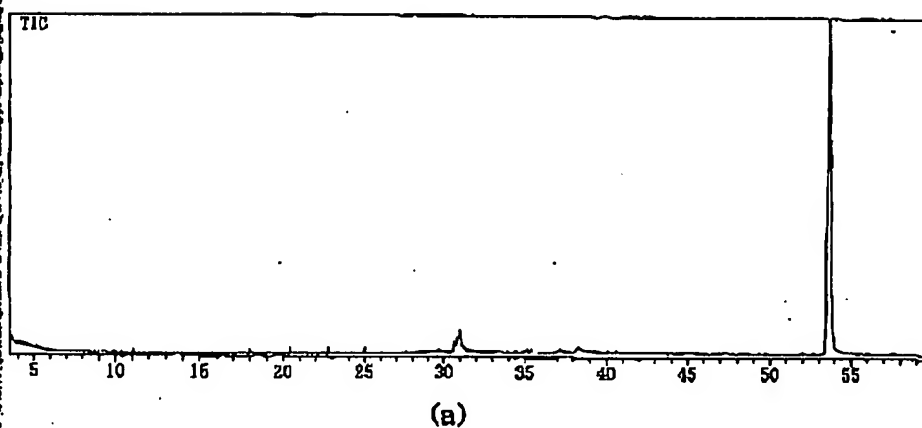
(62) 01-288256 (P2001-288256A)

【図6】



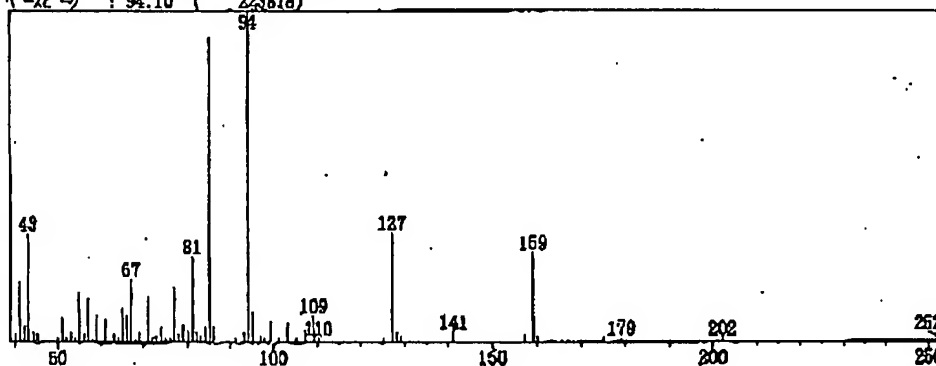
(株) 01-288256 (P2001-288256A)

【図7】



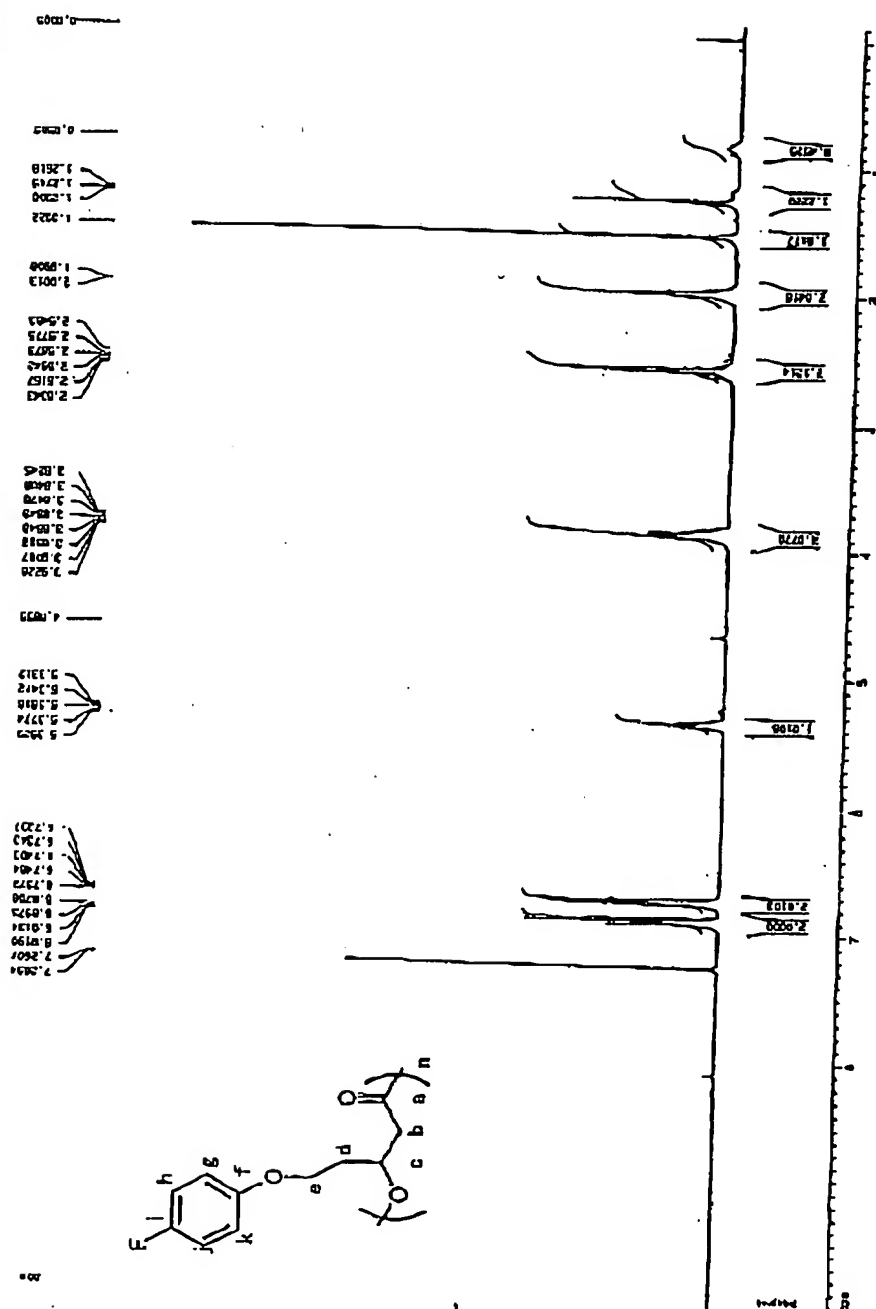
【図21】

ピーク番号 : 9351 分子量 : ( 8551 ~ 9818 )  
ピーク番号 : 55 保持時間 : 81.417  
ピーク番号 : 94.10 ( 223818 )



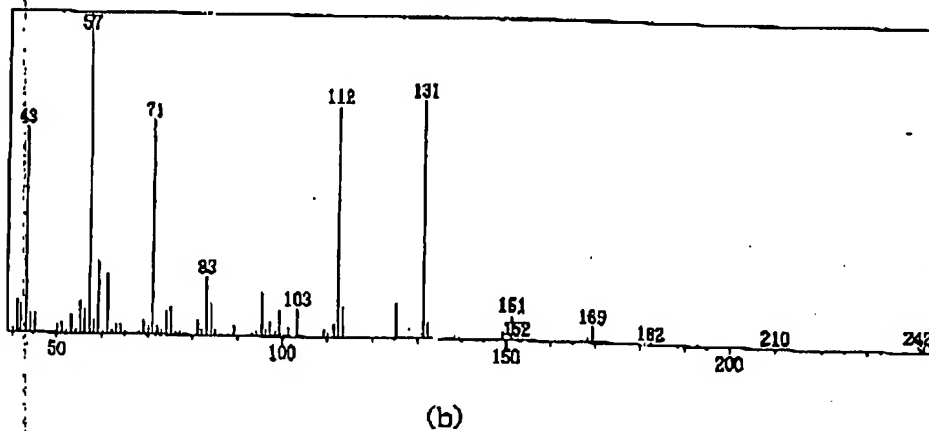
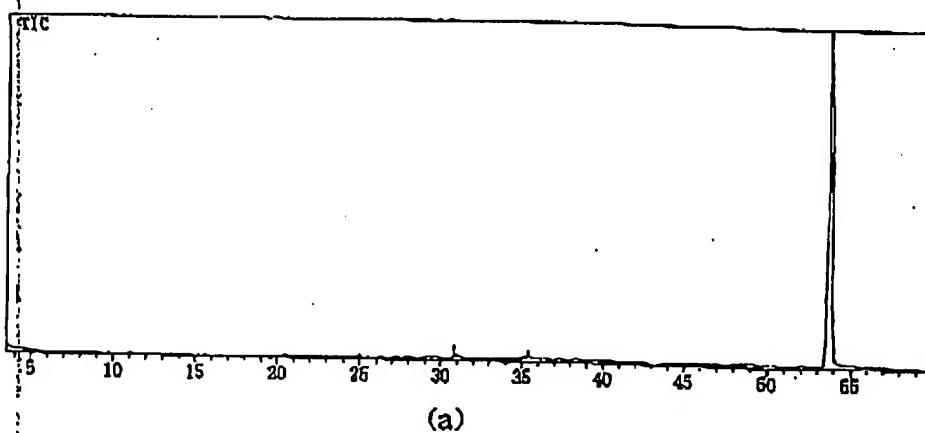
(64) 01-288256 (P2001-288256A)

【8】



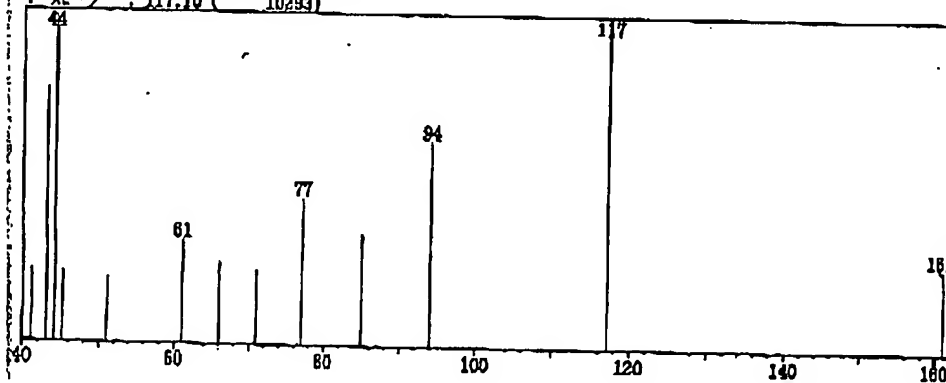
(5) 01-288256 (P2001-288256A)

【図9】



【図22】

検出番号 : 4732  
ピーク数 : 13 保持時間 : 42.825  
分子量 : 117.10 (10293)









(8) 01-288256 (P2001-288256A)

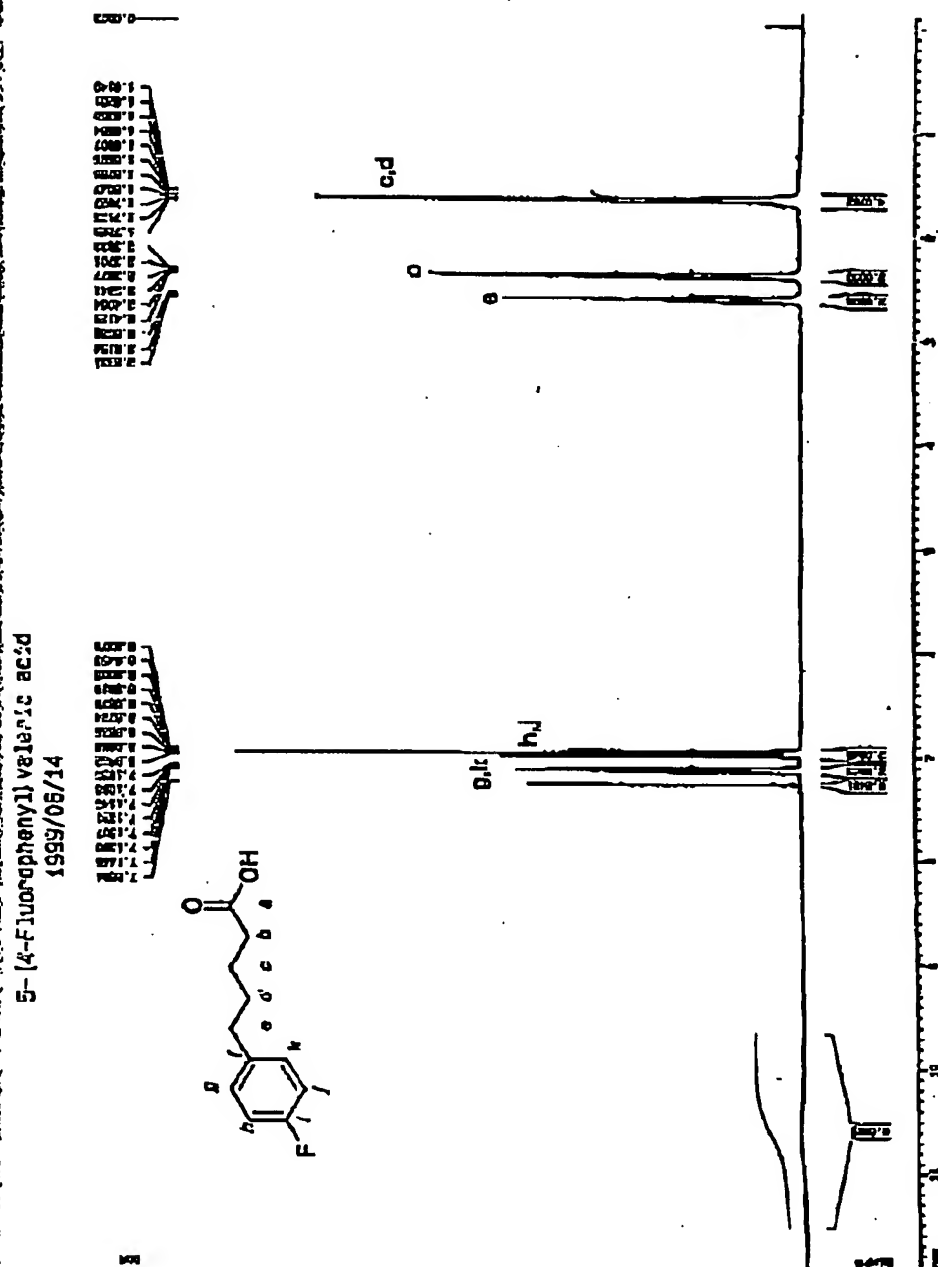
[12]

*Pseudomonas jessenii* P161; FERM P-17445 の 16S rRNA 配列

TGAACGCTGGCGGCAGGCCTAACACATGCAAGTCGAGCGGATGACGGGAGCTTGCTC  
CTGAATTCAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGCCTAGGAATCTGCCTGGTAGTGGGGGAC  
AACGTCTCGAAAGGGACGCTAATACCGCATACGCTACGGGAGAAAGCAGGGGACCT  
TCGGGCCTTGCGCTATCAGATGAGCCTAGGTCCGATTAGCAGTTGGTGAGGTAATGC  
CTCACCAAGGCGACCATCCGAACTGCTCTGAGAGGATGATCAGTCACACTGGAAGT  
AGACACGGTCCAGACTCCTACGCGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGAA  
AGCCTGATCCACCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGTCTTCGCAATTGTAAGCACTTTAA  
GTTGGGAGGAAGGGCATTAACTAAACGTTAGTGTGTTTGACGTTACCGACAGAATAAG  
CACGGGCTAACTCTGTGCCAGCAGCCGCGTAATACAGAGGGTGCAAGCGTTAATCGG  
AATTACTGGGCGTAAAGCAGCGCTAGGTGGTTTGTAAAGTTGGATGTGAAAGCCCCGG  
GCTCAACCTGGGAAGTGCATTCAAACTGACAAGCTAGAGTATGGTAGAGGGTGCTGGA  
ATTTCTGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATAGCAAGGAACACCAAGTGGCGAAGGCG  
ACCACCTGGACTGAAGTACACTGAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAG  
ATACCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGTCAACTAGCCGTTGGGAGCCTTGAGCTCT  
TAGTGGCGCAGCTAACGCATTAAAGTTGACCGCCTGCGGAGTACGGCCCCAAGGTTAAA  
ACTCAAATGAATTGACGGGGGCCCCGACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTGGAAG  
CAACGCGAAGAACCTTACCAGGCCTGACATCCAATGAACTTCCAGAGATGGATGGGT  
GCCTTCGGGAACATTGAGACAGGTGCTGCATGGCTGTGCTCAGCTCGTGTGCTGAGAT  
GTTGGGTTAAGTCCCGTAACGAGCGCAACCCGTGCTTAGTTACCAGCACGTAATGGT  
GGGCACTCTAAGGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAG  
TCATCATGGCCCTTACGGCCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGTGGGTACAGAGGGT  
TGCCAAGCCGCGAGGTGGAGCTAATCCACAAAACCGATCGTAGTCCGGATCGCAGTC  
TGCAACGCGACTGCGTGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCCAATCAGAATGTGCGGGT  
GAATACGTTCCCGGGCCTTGACACACCGCCCGTCACACCATGGGAGTGGGTCCACC  
AGAAGTAGCTAGTCTAACCTTCGGGAGGACGGTTACCAAGGTGTGATTCATGACTGGG  
GTGAAGTCGTACCAAGCTAGCGTAGGGGAACCTGCGGCTGGATCAC

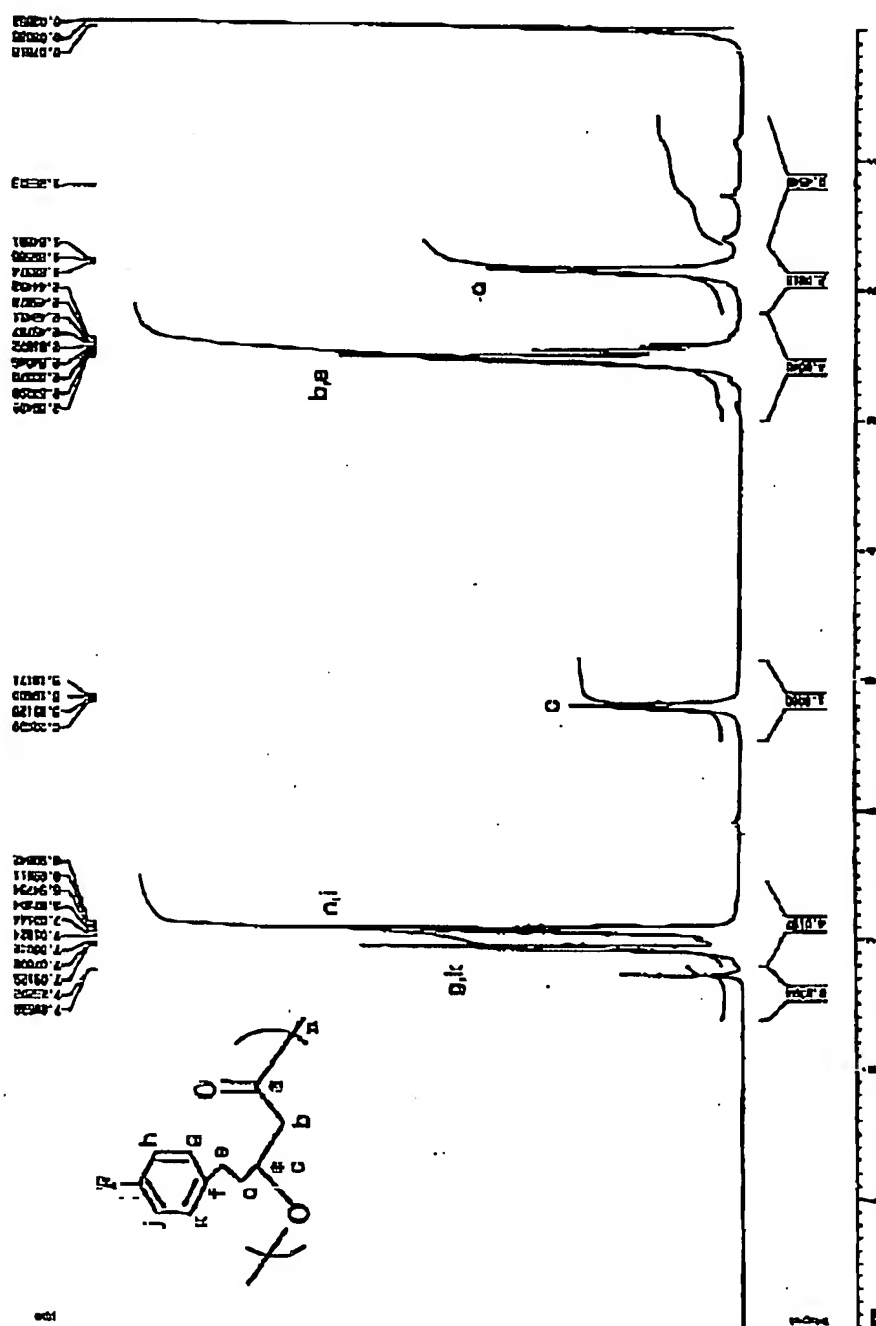
(59) 101-288256 (P2001-288256A)

【図13】



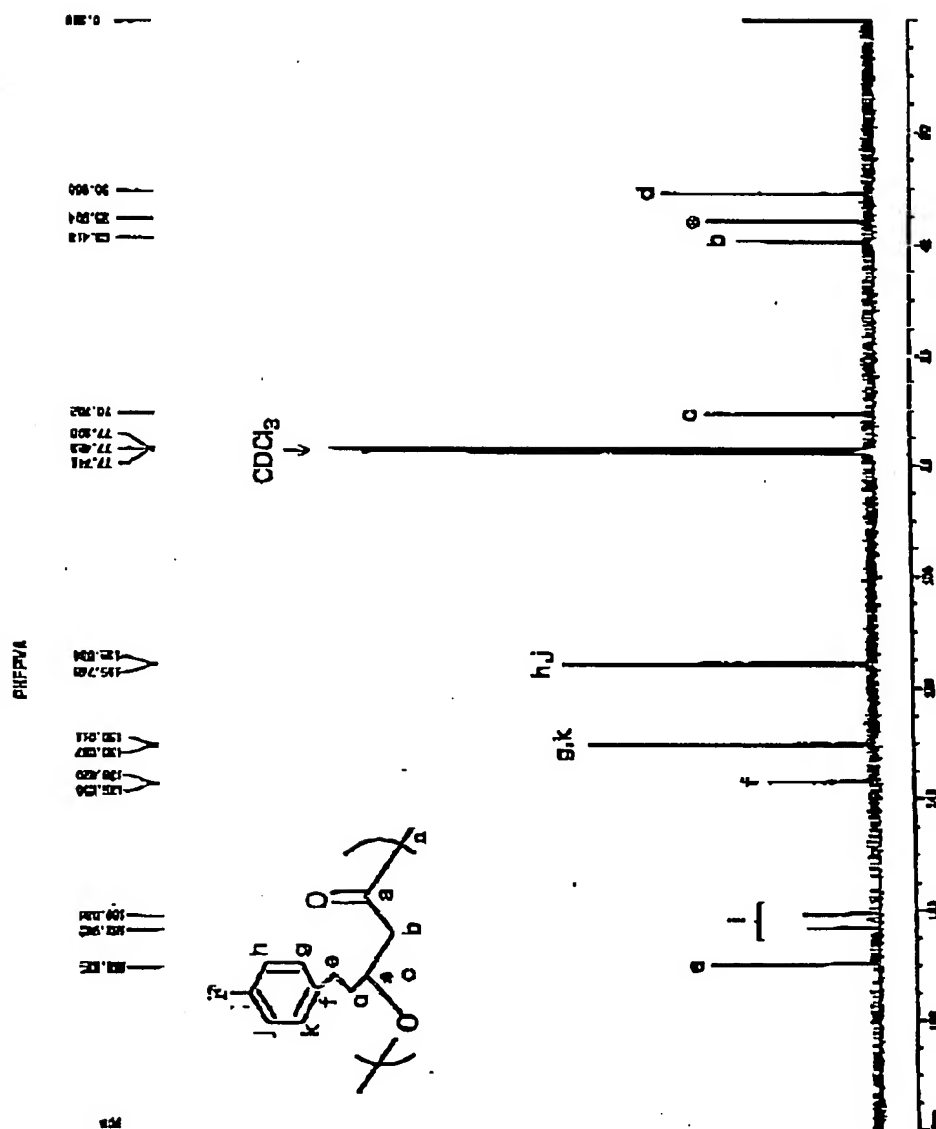
(70) 01-288256 (P2001-288256A)

[14]



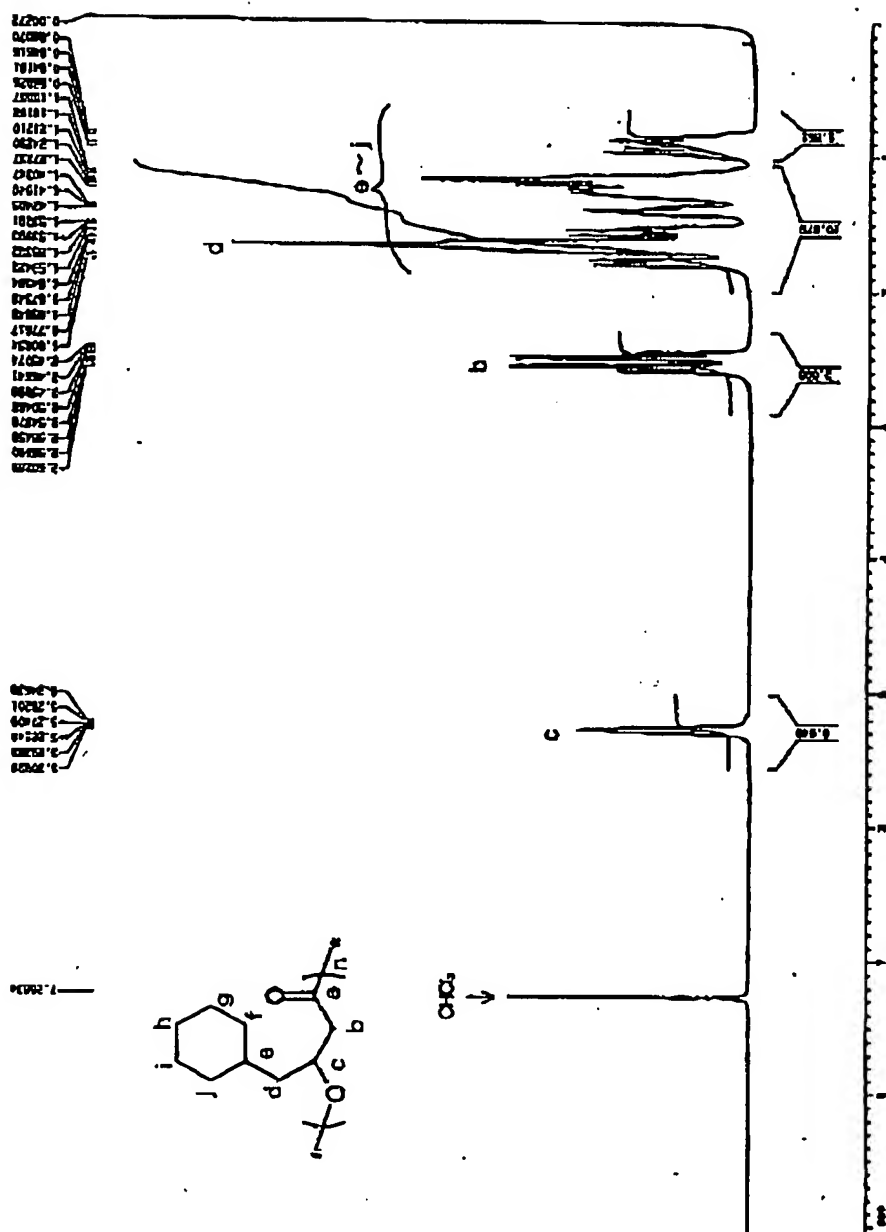
(71) 01-288256 (P2001-288256A)

【图15】



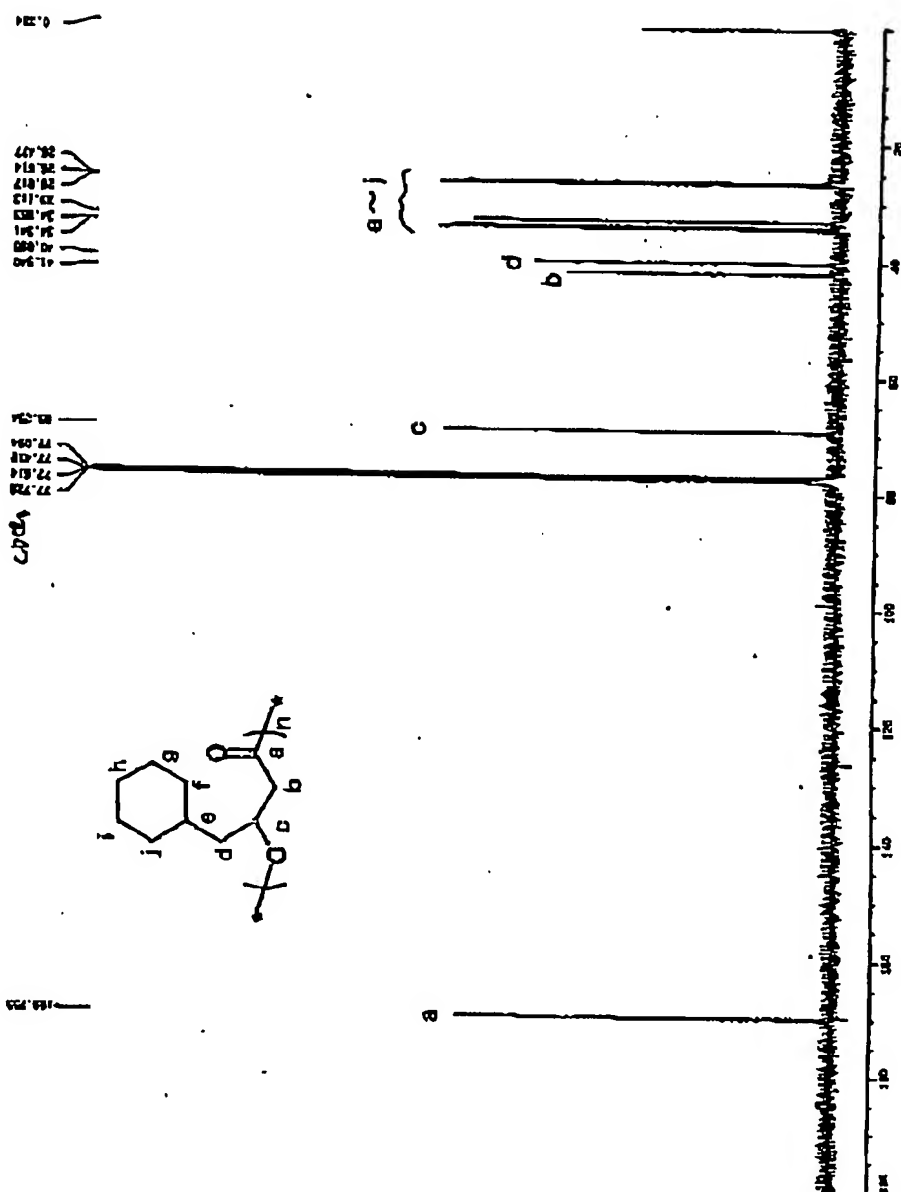
(72) 01-288256 (P2001-288256A)

【图16】



(73) 01-288256 (P2001-288256A)

【图17】

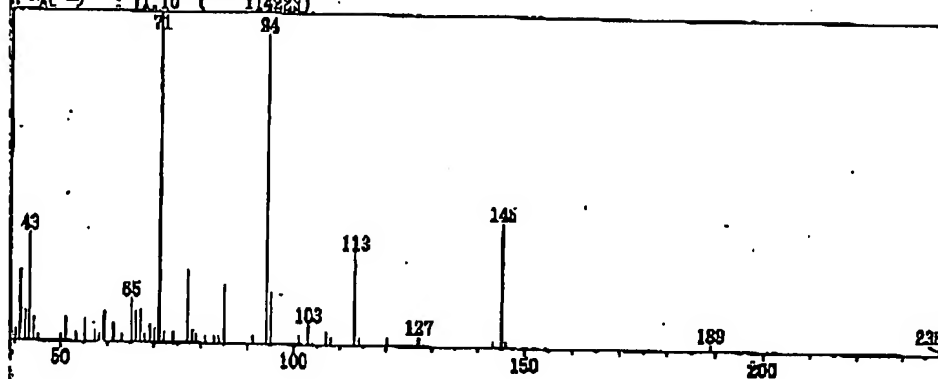




(74) 01-288256 (P2001-288256A)

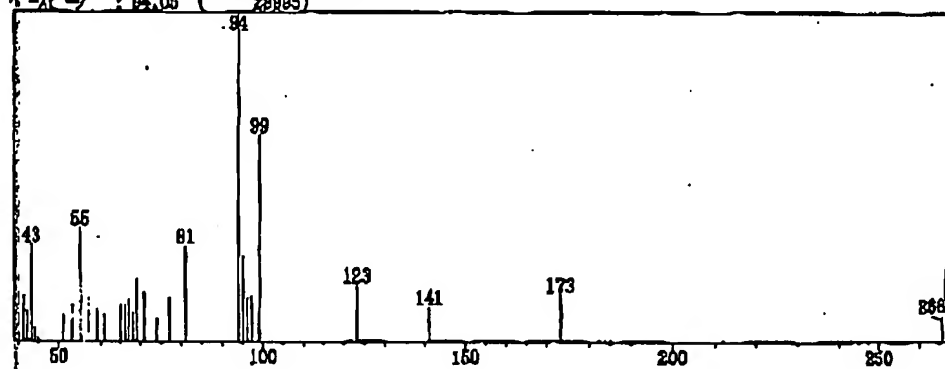
【図23】

サンプル番号 : 7898    分子量 : ( 8972 - 7878 )  
 ピーク数 : 47    保持時間 : 65.125  
 ベースピーク : 71.10 ( 14223 )



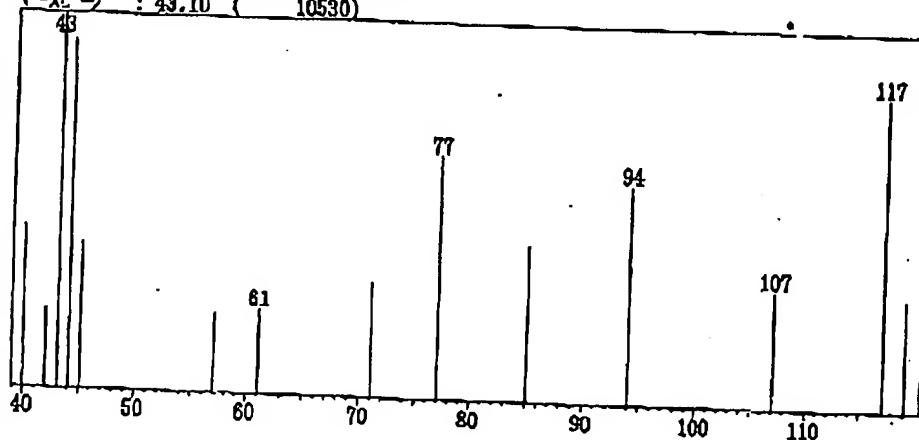
【図24】

サンプル番号 : 11826    分子量 : ( 11180 - 12354 )  
 ピーク数 : 30    保持時間 : 102.042  
 ベースピーク : 84.05 ( 28985 )



【図25】

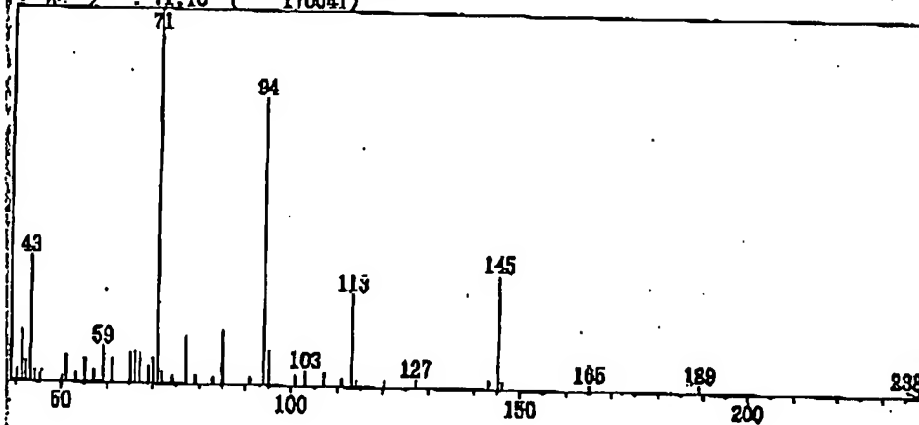
サンプル番号 : 4732  
 ピーク数 : 14    保持時間 : 42.925  
 ベースピーク : 43.10 ( 10530 )



(75) 01-288256 (P2001-288256A)

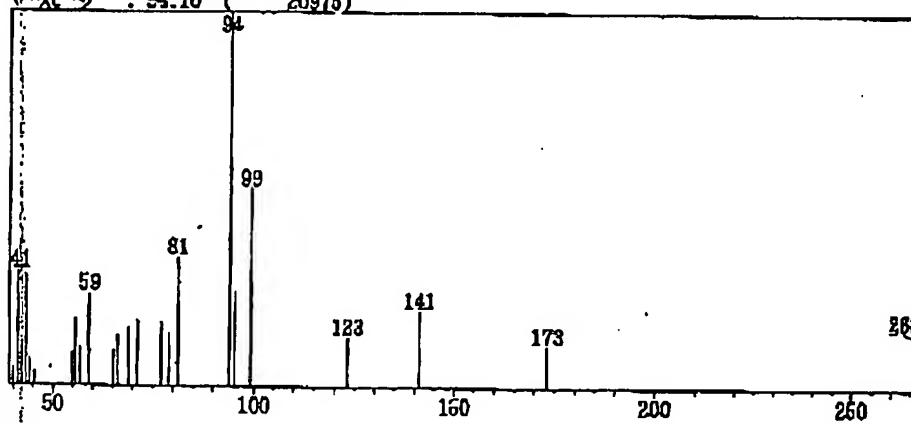
【図26】

検出番号 : 7400 パックラウト : ( 8837 - 8167 )  
ピーク数 : 42 保持時間 : 85.158  
ピーク : 71.10 ( 170041 )



【図27】

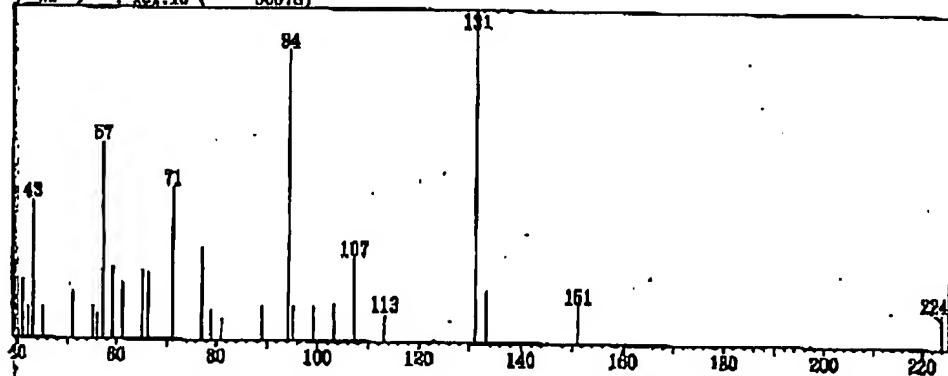
検出番号 : 11818 パックラウト : ( 11628 - 11878 )  
ピーク数 : 24 保持時間 : 101.958  
ピーク : 94.10 ( 20975 )



(76) 001-288256 (P2001-288256A)

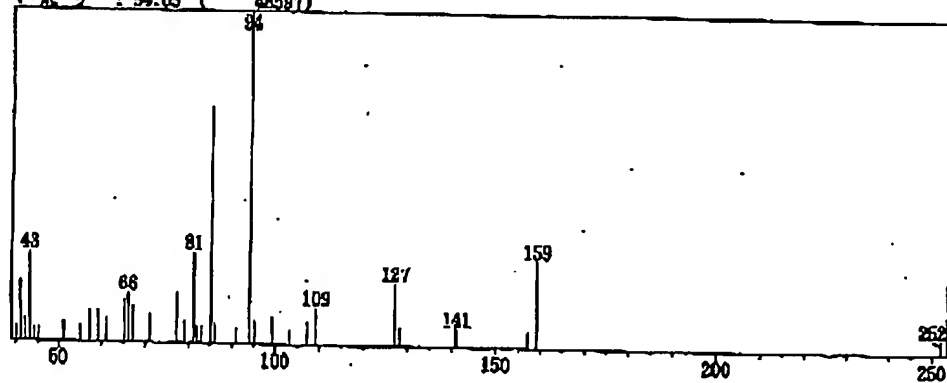
【図28】

検出番号 : 5787 分子量範囲 : ( 5691 - 5888 )  
 ピーク数 : 29 保持時間 : 51.717  
 ベースピーク : 131.15 ( 80678 )



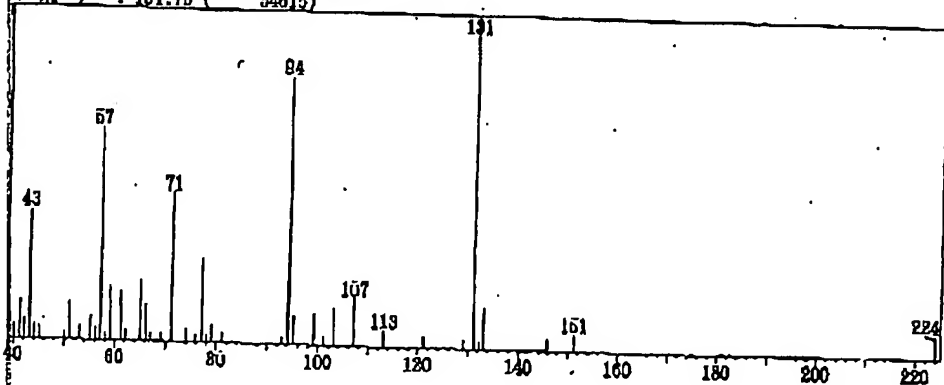
【図29】

検出番号 : 8334 分子量範囲 : ( 8108 - 8553 )  
 ピーク数 : 35 保持時間 : 81.275  
 ベースピーク : 94.05 ( 48587 )



【図31】

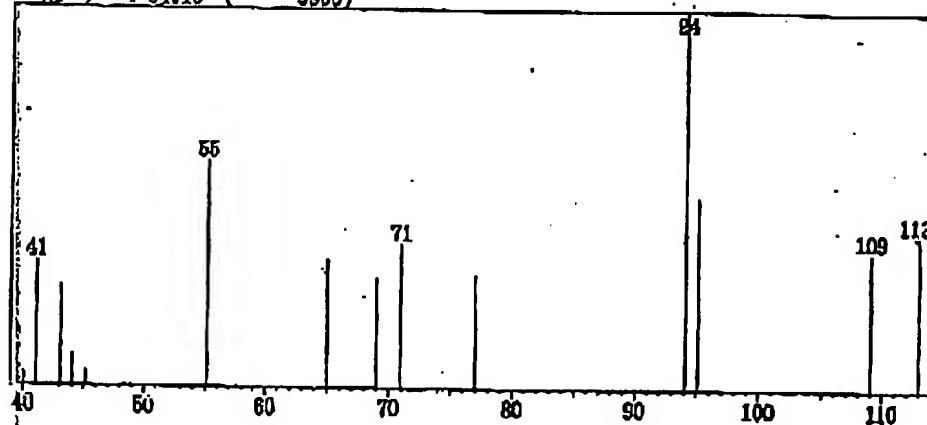
検出番号 : 5774 分子量範囲 : ( 5847 - 5930 )  
 ピーク数 : 49 保持時間 : 51.608  
 ベースピーク : 131.15 ( 94815 )



(77) 01-288256 (P2001-288256A)

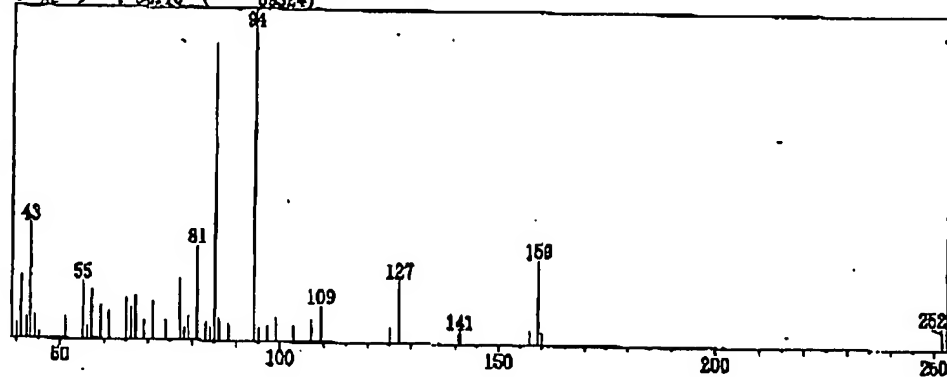
【図30】

検出番号 : 15229 分子量範囲 : ( 15049 - 15439 )  
ピーク数 : 14 保持時間 : 180.400  
分子量 : 94.10 ( 5986 )



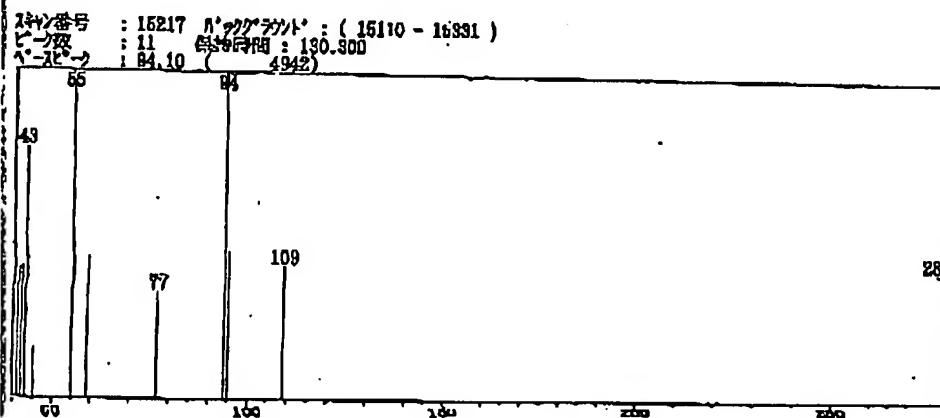
【図32】

検出番号 : 9318 分子量範囲 : ( 9062 - 9683 )  
ピーク数 : 41 保持時間 : 81.142  
分子量 : 84.10 ( 59324 )

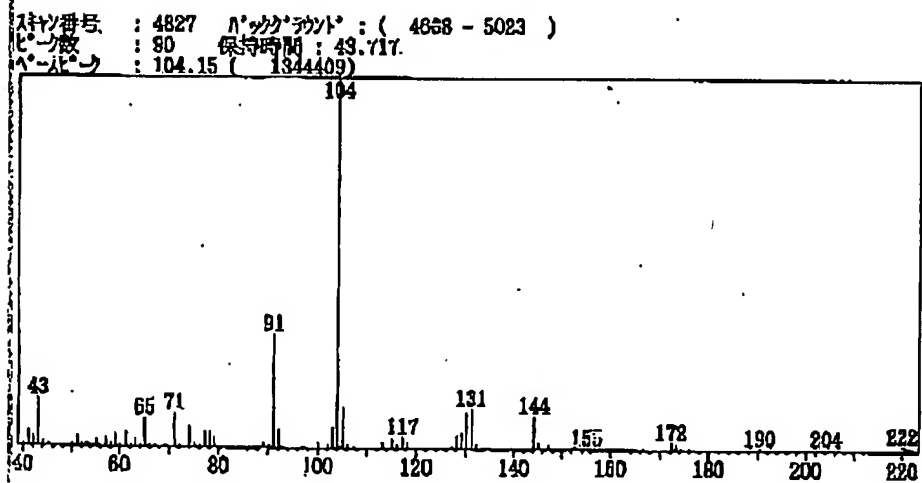


(78) 01-288256 (P2001-288256A)

【図33】



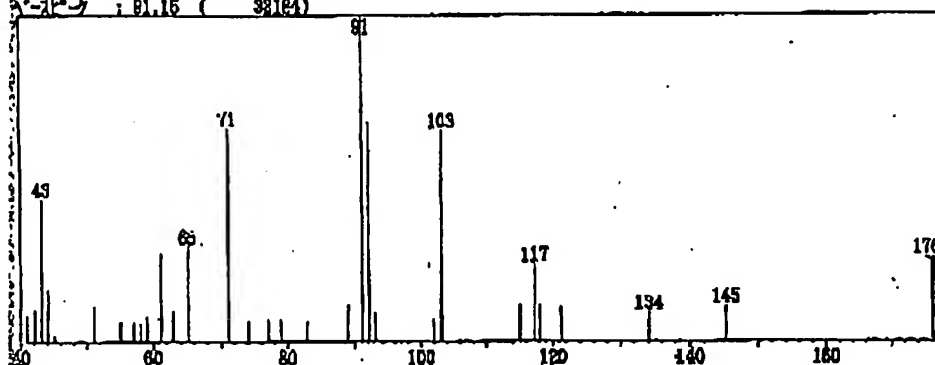
【図34】



(79) 101-288256 (P2001-288256A)

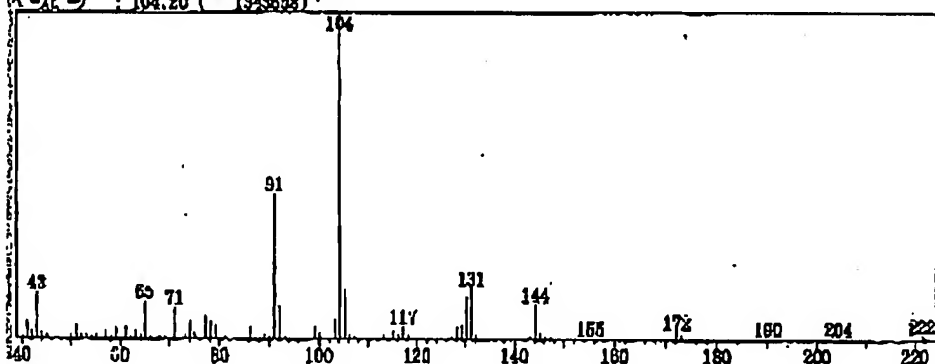
【図35】

検体番号 : 3553 分子量範囲 : ( 3537 - 3574 )  
 ピーク数 : 91 保持時間 : 33.125  
 分子量 : 81.16 ( 32164 )



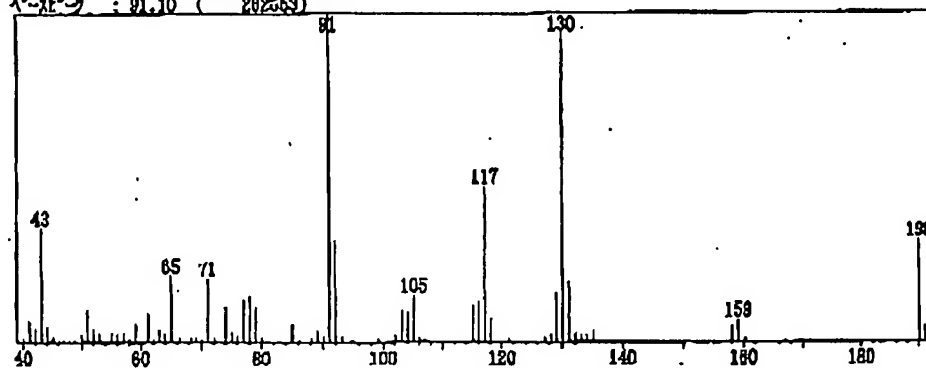
【図36】

検体番号 : 4824 分子量範囲 : ( 4813 - 5115 )  
 ピーク数 : 90 保持時間 : 43.692  
 分子量 : 104.20 ( 1343638 )



【図37】

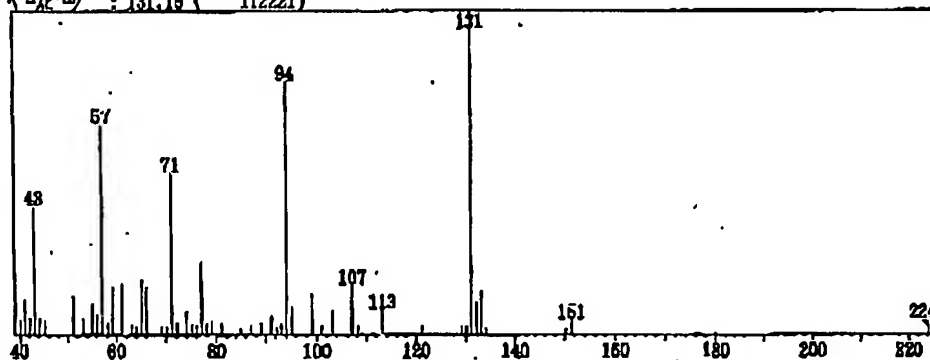
検体番号 : 4142 分子量範囲 : ( 4102 - 4184 )  
 ピーク数 : 68 保持時間 : 38.008  
 分子量 : 81.10 ( 282553 )



(80) 101-288256 (P2001-288256A)

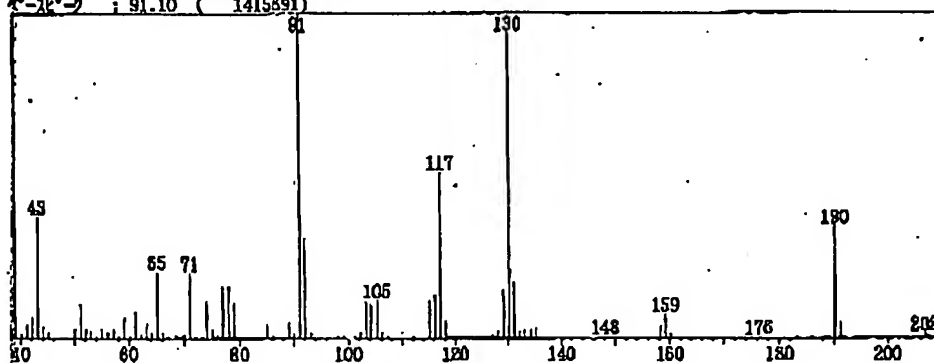
【図38】

検出番号 : 5779 分子量 : ( 5802 - 5982 )  
 ピーク数 : 61 保持時間 : 51.850  
 分子量 : 131.15 ( 112221 )



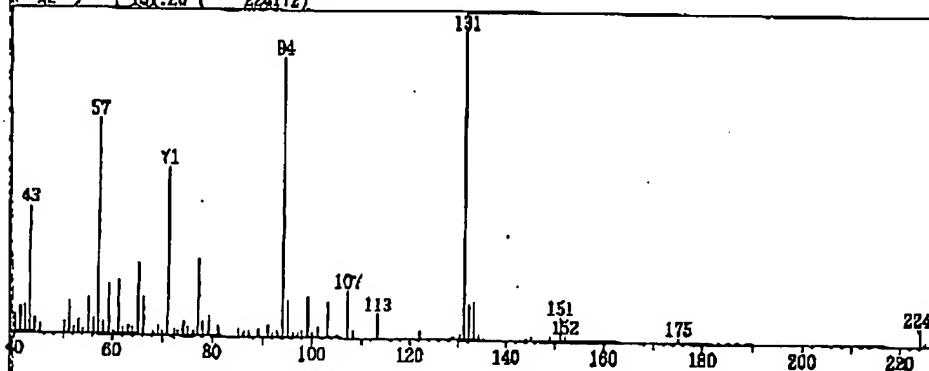
【図39】

検出番号 : 4141 分子量 : ( 3936 - 4253 )  
 ピーク数 : 80 保持時間 : 38.000  
 分子量 : 91.10 ( 1415891 )



【図40】

検出番号 : 6775 分子量 : ( 5579 - 5930 )  
 ピーク数 : 78 保持時間 : 51.617  
 分子量 : 131.20 ( 224172 )



(81) 01-288256 (P2001-288256A)

フロントページの続き

(51) Int. Cl.

識別記号

FI

(参考)

(C12N 1/20  
C12R 1:40)  
(C12P 7/62  
C12R 1:38)  
(C12P 7/62  
C12R 1:40)

(C12N 1/20 D  
C12R 1:40)  
(C12P 7/62  
C12R 1:38)  
(C12P 7/62  
C12R 1:40)

(31)優先権主張番号 特願平11-371869  
(32)優先日 平成11年12月27日(1999. 12. 27)  
(33)優先権主張国 日本(JP)  
(31)優先権主張番号 特願2000-23024(P2000-23024)  
(32)優先日 平成12年1月31日(2000. 1. 31)  
(33)優先権主張国 日本(JP)  
(31)優先権主張番号 特願2000-23025(P2000-23025)  
(32)優先日 平成12年1月31日(2000. 1. 31)  
(33)優先権主張国 日本(JP)

(72)発明者 本間 務  
東京都大田区下丸子3丁目30番2号 キヤ  
ノン株式会社内

(72)発明者 見目 敬  
東京都大田区下丸子3丁目30番2号 キヤ  
ノン株式会社内

(72)発明者 須田 栄  
東京都大田区下丸子3丁目30番2号 キヤ  
ノン株式会社内

(72)発明者 小林 登代子  
東京都大田区下丸子3丁目30番2号 キヤ  
ノン株式会社内

(72)発明者 小林 辰  
東京都大田区下丸子3丁目30番2号 キヤ  
ノン株式会社内

Fターム(参考) 4B064 AD83 CA02 CB24 CC03 CD07  
CD21 DA01 DA16 DA20  
4B065 AA41X AA44X AC14 AC16  
BB08 BB29 BD11 BD15 BD16  
CA12 CA44 CA54 CA60  
4J029 AA02 AB01 AB04 AC01 AD01  
EA02 EA05 EB01 ED03 EE04  
JC771 JD08 JE241



**METHOD FOR PRODUCTION COPOLYMER AND MICROORGANISM PRODUCTION THE SAME****Publication number:** JP7031490**Publication date:** 1995-02-03**Inventor:** ETANI HIROSHI; IWAKI NAKKO; FUKUSHIMA TAKESHI; HIRANO GENZO**Applicant:** JAPAN STEEL WORKS LTD**Classification:****- International:** C08G63/08; C08G63/60; C12N1/20; C12P7/62; C12R1/38; C08G63/00; C12N1/20; C12P7/62; (IPC1-7): C12P7/62; C08G63/08; C12N1/20; C12P7/62; C12R1/38; C12N1/20; C12R1/38**- European:****Application number:** JP19930184142 19930726**Priority number(s):** JP19930184142 19930726[Report a data error here](#)**Abstract of JP7031490**

**PURPOSE:** To efficiently obtain a copolymer useful for medicines, foods, sanitary articles, etc., by culturing a microorganism belonging to the genus *Pseudomonas* and producing a copolymer having specific physicochemical properties, specified constituents, etc. **CONSTITUTION:** The production method of the objective copolymer comprises culturing a microorganism belonging to the genus *Pseudomonas*, such as *Pseudomonas* S.P. 31-1 strain (FERM P-13280) and producing a copolymer in an amount of 80-95% in the dried cells, the copolymer comprising (A) (i) 1-40% of 3-hydroxyhexanoate units, (ii) 10-85% of 3-hydroxyoctanoate units, (iii) 0-70% of 3-hydroxydecanoate units, and (iv) 0-40% of 3-hydroxydodecanoate units, and having physicochemical properties comprising (B) a number-average mol.wt. of 50000-1000000, (C) a melting point of 35-70 deg.C or no clear melting point, (D) a glass transition point of -20 to -60 deg.C, and (E) solubility: soluble in chloroform, dichloromethane, 1,2-dichloroethane, acetone; and in soluble in water.

Data supplied from the [esp@cenet](#) database - Worldwide



European Patent Office  
Postbus 5818  
2280 HV RIJSWIJK  
NETHERLANDS  
Tel: +31 70 340 2040  
Fax: +31 70 340 3016

Europäisches  
Patentamt

European  
Patent Office

Office européen  
des brevets

Staker, Allan Robert  
212 Euclid Ave.,  
Apt. 310  
Long Beach, CA 90803  
ETATS-UNIS D'AMERIQUE



EPO Customer Services

Tel.: +31 (0)70 340 45 00

Date

05-09-2007

Reference	Application No./Patent No. 05848786.9 - 1241 PCT/US2005039817
Applicant/Proprietor Staker, Allan Robert, et al	

#### Noting of loss of rights pursuant to Rule 69(1) EPC

The European patent application cited above is deemed to be withdrawn (Rule 108(1) EPC) for the following reason(s):

- a) ☐ translation of the international application into one of the EPO's official languages (Art. 158(2) EPC) not filed within the period specified in Rule 107(1)(a) EPC
- b) ☒ national basic fee  
☒ search fee  
☐ designation fee  
☐ examination fee and/or written request for examination  
 not validly paid / not made within the time limit specified in Rule 107(1)(c)-(f) EPC
- (c) ☐ payment of the above fees on ....., after expiry of the period for payment (on 04.06.07).

#### MEANS OF REDRESS:

- The loss of rights [(a)(b)] shall be deemed not to have occurred if, within a (non-extendable) period of **TWO MONTHS** of notification of this communication, the relevant requirement(s) has (have) been fulfilled and the appropriate surcharge(s) under Article 2(3b)(3c) RFees have been paid (Rule 108(3) EPC).  
 If fees were paid late [(c)], the requirement(s) as specified in Article 8(3)(4) RFees is (are) to be fulfilled within the same time limit.
- If, however, the applicant considers that this finding is inaccurate, he may apply in writing for an EPO decision on the matter (Rule 69(2) EPC) within the same time limit, i.e. that specified in (1). The finding will be set aside only if it does not actually correspond to the factual or legal situation.  
 The applicant's rights with regard to fee payment or filing the written request for examination cannot be re-established under Article 122 EPC.
- If, in spite of all due care required by the circumstances having been taken, the applicant was unable to observe the time limit for filing the translation, he will, upon application, have his rights re-established provided that the time limits and formal requirements laid down in Article 122 EPC are complied with.

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平7-31490

(43) 公開日 平成7年(1995)2月3日

(51) Int.Cl.	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 P 7/62		7432-4B		
C 0 8 G 63/06	N P S			
C 1 2 N 1/20		A 7236-4B		
// (C 1 2 P 7/62				
C 1 2 R 1:38)				

審査請求 未請求 請求項の数2 OL (全16頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特開平5-184142	(71) 出願人	000004215 株式会社日本製鋼所 東京都千代田区有楽町一丁目1番2号
(22) 出願日	平成5年(1993)7月26日	(72) 発明者	恵谷 浩 千葉県四街道市鷹の台1丁目3番 株式会 社日本製鋼所内
		(72) 発明者	岩城 尚子 千葉県四街道市鷹の台1丁目3番 株式会 社日本製鋼所内
		(72) 発明者	福島 武 千葉県四街道市鷹の台1丁目3番 株式会 社日本製鋼所内
		(74) 代理人	弁理士 有賀 三幸 (外3名) 最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 共重合体の製造方法及び該共重合体を生成する微生物

(57) 【要約】

【構成】 シュードモナス属に属し、乾燥菌体中80～95%、モノマーユニット3HHx及び3HO、更に場合により3HD及び3HDDからなる共重合体を産生する微生物を培養し、該共重合体を採取する該共重合体の製造方法。

【効果】 医薬品、食品、衛生用品、農園芸品、包装材料等に有用な共重合体を高収率で得ることができる。

(2)

特開平7-31490

1

2

【特許請求の範囲】

\* することを特徴とする共重合体の製造方法

【請求項 1】 シュードモナス属に属し、乾燥菌体中に  
80～95%下記理化学的性質(A)～(E)を有する  
共重合体を産生する微生物を培養し、該共重合体を採取\*

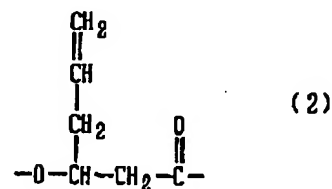
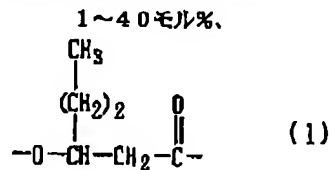
(A) 構成成分及び組成

下記(a)、(b)、(c)及び(d)；

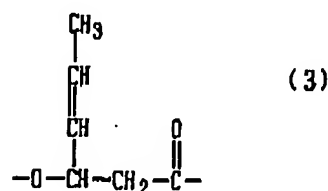
(a) 下記式(1)及び/又は(2)及び/又は(3)で表わされる3-ヒド  
ロキシヘキサノエート単位

【化1】

10



20



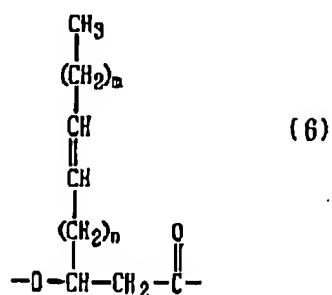
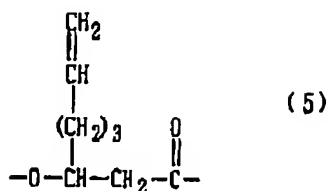
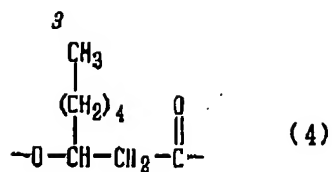
(b) 下記式(4)及び/又は(5)及び/又は(6)で表わされる3-ヒド  
ロキシオクタノエート単位

【化2】

10～95モル%

(3)

特開平7-31490



(式中、 $m$ 及び $n$ は0～2の整数を表わし、 $m+n=2$ である。)

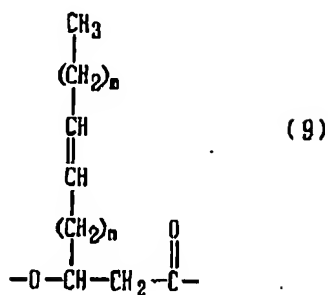
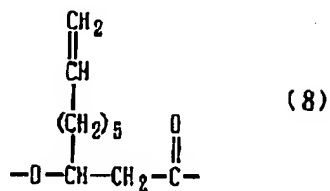
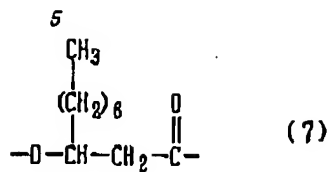
(c) 下記式(7)及び又は(8)及び又は(9)で表わされる3-ヒドロキシデカノエート単位 0～70モル%、

[化3]

(4)

特開平7-31490

6



(式中、m及びnは0～4の整数を表わし、m+n=4である。)

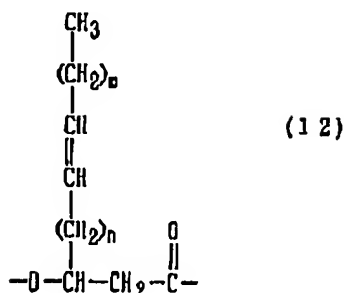
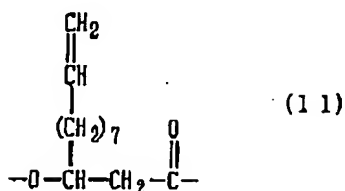
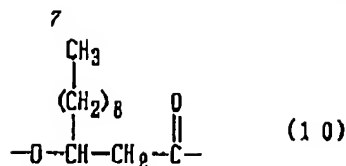
(d) 下記式(10)及び又は(11)及び又は(12)で表わされる3-ヒドロキシデカノエート単位 0～40モル%、

【化4】

(5)

特開平7-31490

8



(式中、m及びnは0～6の整数を表わし、m+n=6である。)

からなる共重合体。

(B) 数平均分子量

50,000～1,000,000。

(C) 融点

35～70℃又は明確な融点を示さない。

(D) ガラス転移点

-20～-50℃。

(E) 溶解性

クロロホルム、ジクロロメタン、1,2-ジクロロエタン及びアセトンに可溶、水に不溶。

【請求項2】 請求項1記載の共重合体を生成するシュードモナス・エスピー (Pseudomonas sp.) 31-1株 (微工研菌寄第13280号)。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は、医薬品、食品、衛生用品、農薬、包装材料等広範な分野に応用可能な生分解性の共重合体の製造方法及び該共重合体を生成する微生物に関する。

【0002】

【従来の技術】 微生物の多くは、各種の共重合体を生成することが知られている。それらの共重合体は熱可塑性を有する。いわゆるプラスチックから、粘弾性を有するゴム状のものまで、多岐にわたっており、しかも、これらはいずれも生分解性を有するものである。

【0003】 例えば、近年、エネルギー貯蔵物質として

注目されているポリ-3-ヒドロキシブチレート (P (3HB)) については特開昭56-117793号、同57-74084号、同57-150393号に、3-ヒドロキシブチレートと3-ヒドロキシバリラートの共重合体 (P (3HB-co-3HV)) については特開昭57-150393号、同58-69224号、同58-212792号、同59-220192号、同59-205992号、同61-293385号、同63-269989号に、3-ヒドロキシブチレートと4-ヒドロキシブチレート (P (3HB-co-4HB)) については特開平1-48821号、同1-156320号、同1-222788号、同1-304891号、同2-27992号、同2-234683号、同3-216193号等にそれぞれ共重合体及びその製造方法が開示されている。

【0004】 更に、A. Steinbuchelらの、Appl. Environ. Microbiol. Vol. 56, No. 11, p3360-3367 (1990) には、3-ヒドロキシヘキサノエートと3-ヒドロキシオクタノエートの共重合体 (P (3HHx-co-3HO)) 等の3HB単位を持たない共重合体が微生物によって生成されることが報告されている。すなわち、炭素源としてオクタン酸を添加した栄養塩培地で、例えばシュードモナス・オーレオファシンス DSM50082を培養すると乾燥菌体中18.0%の (P (3HHx-co-3HO)) [3HHx 20.8モル%, 3H

(6)

特開平7-31490

9

089. 2モル%)を生成し、シュードモナス・シトロネロリス DSM50332を培養すると乾燥菌体中75.3%の[P(3HO-co-3HD)](3HHx93.8モル%, 3HD6.2モル%)を生成し、また、シュードモナス・オレオボランス ATCC29347を培養すると乾燥菌体中44.0%の[P(3HHx-co-3HO, 3HD)](3HHx5.4モル%, 3HO92.0モル%, 3HD2.6モル%)を生成する。更に、炭素源としてグルコン酸を添加した栄養塩培地で、例えばシュードモナス・メンドシナ DSM60017を培養すると乾燥菌体中50.7%のP(3HHx-co-3HO, 3HD, 3HDD)(3HHx4.3モル%, 3HO29.8モル%, 3HD61.9モル%, 3HDD4.2モル%)を生成する。

【0005】これら生分解性の共重合体は加水分解性を有し、土中や河川水中、海水中、生体内の微生物の作用で二酸化炭素と水に分解され自然環境に戻るものであり、近年、地球環境保全に対する意識の高まりから注目され、研究開発がなされ、実用化が検討されている。

【0006】

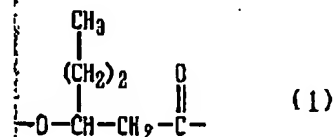
【発明が解決しようとする課題】しかしながら、微生物\*

(a) 下記式(1)及び/又は(2)及び/又は(3)で表わされる3-ヒドロキシヘキサノエート単位(3HHx)

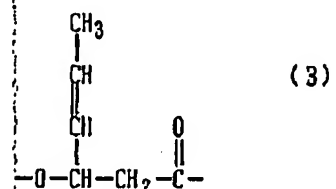
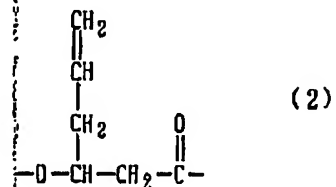
1~40モル%、

【0011】

【化5】



30



40

※

(b) 下記式(4)及び/又は(5)及び/又は(6)で表わされる3-ヒドロキシオクタノエート単位(3HO)

10~95モル%、

【0013】

【化6】

10

\*が生成する共重合体は、その理化学的性質が多岐にわたっており、それぞれの使用目的に適合する共重合体の探索が要求されている。

【0007】一方、共重合体の微生物による生産は、通常の化学合成法による生産に比較して、培地成分が高価である、微生物のポリマー生成速度が遅い、菌体中のポリマー含有率が低い等のため生産コストが高くなるという欠点を有しており、この問題の解決が望まれていた。

【0008】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、かかる実情に鑑み鋭意検討した結果、千葉県佐倉市の土壌より分離したシュードモナス属に属する細菌を培養すれば、3HB単位を有しない共重合体が極めて高収率で得られることを見出し、本発明を完成するに至った。

【0009】すなわち、本発明は、シュードモナス属に属し、乾燥菌体中に80~95%下記理化学的性質、

(A)~(E)を有する共重合体を産生する微生物を培養し、該共重合体を採取することを特徴とする共重合体の製造方法を提供するものである。

20 【0010】(A)構成成分及び組成

下記(a)、(b)、(c)及び(d)；

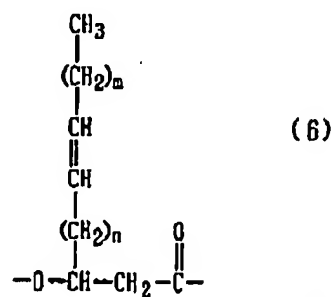
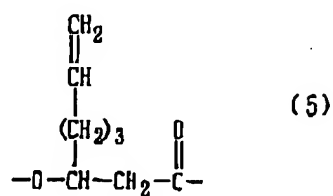
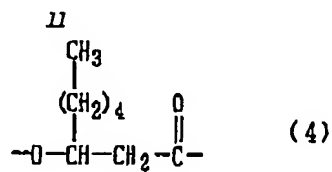
※【0012】



(7)

特開平7-31490

12



(式中、m及びnは0～2の整数を表わし、m+n=2である。)

[0014]

(c) 下記式(7)及び/又は(8)及び/又は(9)で表わされる3-ヒドロキシデカノエート単位(8HD)

0～70モル%、

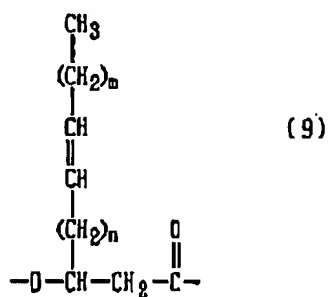
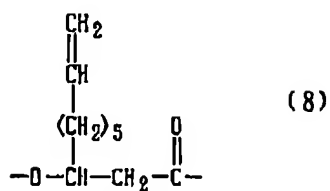
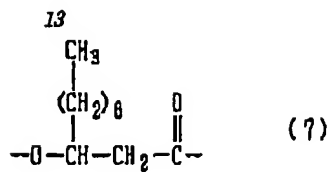
[0015]

{化7}

(8)

特開平7-31490

14



(式中、m及びnは0～4の整数を表わし、m+n=4である。)

[0016]

(d) 下記式(10)及び又は(11)及び又は(12)で表わされる3-ヒドロキシデカノエート単位(3HDD) 0～40モル%、

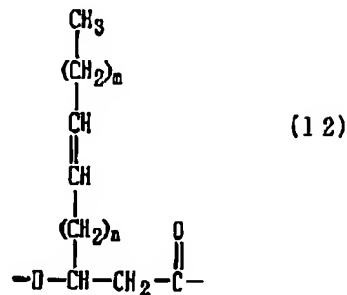
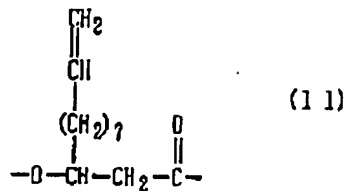
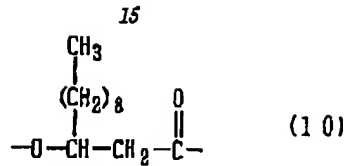
[0017]

[化8]

(9)

特開平7-31490

16



(式中、m及びnは0～6の整数を表わし、m+n=6である。)

【0018】 かななる共重合体、

(B) 数平均分子量

50,000～1,000,000。

(C) 融点

35～70℃又は明確な融点を示さない。

(D) ガラス転移点

-20～-50℃。

(E) 溶解性

クロロホルム、ジクロロメタン、1,2-ジクロロエタン及びアセトンに可溶、水に不溶。

【0019】 本発明は、更に上記共重合体を生成するシュードモナス エスピー (*Pseudomonas sp.*) 31-1株 (微生物第13280号) を提供するものである。

【0020】 上記共重合体を生成する微生物の菌学的性質は以下のとおりである。

【0021】 (1) 形態学的性質

寒天培地、30℃、一夜培養で0.6～0.8μm×1.7～2.3μmの直状桿菌である。液体培地、30℃、一夜培養で0.8～1.1μm×2.5～5.7μmの直状桿菌である。べん毛染色で極毛が観察され、運動性が認められる。多形性、孢子、グラム染色性及び抗原性は認められない。

【0022】 (2) 各種培地における生育状態

(イ) 肉汁寒天平板培養

コロニーは平滑で周縁はやや粗造である。特徴的コロニー

一色素、拡散性色素の産生は認められない。

(ロ) 肉汁寒天斜面培地

菌苔は平滑で周縁はやや粗造である。特徴的コロニー色素、拡散性色素の産生は認められない。

(ハ) 肉汁液体培地

30 培地全体に生育が認められるが、表面皮膜は認められない。

(ニ) 肉汁ゼラチン穿刺培養

培地の上部に生育が認められるが、液化は認められない。

(ホ) リトマスミルク

アルカリの産生は認められるが、凝固は認められない。

【0023】 (3) 生理的性質

(イ) 硝酸塩の還元 : 陰性

(ロ) 脱窒反応 : 陰性

40 (ハ) MRテスト : 陰性

(ニ) VPテスト : 陰性

(ホ) インドールの生成 : 陰性

(ヘ) 硫化水素の生成

TSI寒天 : 陰性

酢酸鉛寒天 : 陰性

(ト) デンプンの加水分解 : 陰性

(チ) クエン酸塩の利用

Koserの培地 : 陽性

Christensenの培地 : 陽性

50 (リ) 無機窒素源の利用

17

- 硝酸塩 : 陽性  
 アンモニウム塩 : 陽性  
 (ヌ) 色素の生成  
 コロニー : 陰性  
 水溶性 : 陰性  
 (ル) ウレアーゼ : 陰性  
 (ヲ) オキシダーゼ : 陽性  
 (ワ) カタラーゼ : 陽性  
 (カ) 生育の範囲  
 pH : 5.5~9.0  
 温度 : -3~36℃  
 (ヨ) 酸素に対する態度 : 好気性  
 (タ) O/Fテスト (Hugh Leifson法) :  
 ○  
 (レ) 糖類からの酸及びガスの生成 : 表1に記載  
 【0024】  
 [表1]

糖 類	酸の生成	ガスの生成
Ｌ-アラビノース	陽性	陰性
Ｄ-キシロース	陽性	陰性
Ｄ-グルコース	陽性	陰性
Ｄ-マンノース	陽性	陰性
Ｄ-フラクトース	陽性	陰性
Ｄ-ガラクトース	陽性	陰性
麦芽糖	陰性	陰性
ショ糖	陰性	陰性
乳糖	陰性	陰性
トレハロース	陰性	陰性
Ｄ-ソルビット	陰性	陰性
Ｄ-マレニット	陽性	陰性
イノシット	陰性	陰性
グリセリン	陽性	陰性
デンプン	陰性	陰性

【0025】以上の兩学的性質から、この微生物はシュードモナス属に属する菌であり、更に公知の菌株と比較しても同じものが存しないため新規の菌株と判断し、シュードモナス エスピー (Pseudomonas sp.) 31-1と命名して、工業技術院微生物工業技術研究所に微工研開第13280号 (FERM P- 50

(10)

特開平7-31490

18

- 13280) として寄託した。  
 【0026】本発明の微生物は自然又は紫外線、X線、化学薬剤等により変異を起す。従って、本発明の共重合体の製造方法は、これら変異株を用いることもできる。  
 【0027】本発明の菌株を用いて、本発明の共重合体を製造する方法は、培地に該菌株を接種し、培養し、この培養物より乾燥菌体中80~95%を占める共重合体を採取する方法である。この培地中には、炭化し得る炭素源、窒素源及びその他の栄養源を適量含有せしめておく。これらは特に制限はないが、具体的には、炭素源としてはオクタン酸ナトリウム、グルコン酸ナトリウム、吉草酸、ピイオン、シュクロース、デンプン、糖蜜、アラビノース、ソルビトール、メタノール、二酸化炭素等が挙げられ、窒素源としては塩化アンモニウム、硫酸アンモニウム、硝酸ナトリウムなどの無機窒素源の他、酵母エキス、肉エキス、ペプトン、大豆粉、油粕などの有機窒素源も挙げる事ができ、その他の添加物としては、必要に応じてマグネシウム、ナトリウム、カリウム、カルシウム、マンガン、銅、モリブデン、亜鉛、鉄等の金属塩、リン酸塩、硝酸塩、塩化物、炭酸塩等、クエン酸ナトリウム等の有機酸塩が挙げられる。  
 【0028】培養は好気的条件下で行うのが好ましく、静置、振とう、通気攪拌培養のいずれも可能であるが、振とうあるいは通気攪拌培養が有利である。培養温度は約10~36℃が好ましく、特に約20~32℃が好適である。また、培地のpHは約5.5~9.0が適当であるが、特に6.5~8.0が最適である。  
 【0029】培養期間は培地の組成、温度等の培養条件によって異なるが、通常約0.5~6日程度、好ましくは1~3日程度である。  
 【0030】また、このとき主として菌体を増殖させる前段の培養と、窒素及び/又はリンを制限して菌体内に共重合体を生成、蓄積させる後段の培養との二段階により培養したほうが、通常、共重合体の生成量が多くなるため好ましい。すなわち、上記の培養条件で前段の培養を行い、得られた培養液から菌体を濾過あるいは遠心分離のような手段で分離回収し、その菌体を後段の窒素及び/又はリンを制限した培地での培養に移行させるか、又は、前段の培養において窒素及び/又はリンを枯渇させ、菌体を分離回収することなく、その培養液を後段の培養に移行させてもよい。この後段の培養は培養液中に窒素及び/又はリンを実質的に含有させない点でのみ前段の培養と異なる。  
 【0031】以上の培養における培地のオクタン酸ナトリウム等の炭素源の量は、共重合体を生成させることができ、かつ、微生物の生育を阻害しない量であればよいが、共重合体を構成するモノマーユニットの種類あるいはモノマーユニット数の割合により変化させることが好ましい。通常は培養液1 lあたり1~100 g程度、好ましくは5~30 g程度である。

19

【0032】上記により培養された培養物中から、濾過あるいは遠心分離などの通常的手段によって菌体を分離回収し、この菌体を洗浄、乾燥して乾燥菌体を得る。菌体の収量は1~10g/l程度である。この菌体から目的の共重合体を採取するには、常法により、例えばクロロホルムのような有機溶剤で生成した共重合体を抽出し、例えば共重合体を溶解しにくいメタノール、ヘキサンなど貧溶媒を加えて上記共重合体を沈澱させる。

【0033】かくして得られた共重合体は3HHx及び3HO、更に場合により3HD及び3HDDのモノマーユニットがエステル結合した前記理化学的性質を有する共重合体である。各モノマーユニットの割合及び分子量は、オクタン酸ナトリウム、グルコン酸ナトリウムなどの炭素源の種類や濃度を変えることによって、制御することができる。

【0034】

【実施例】以下に本発明を実施例により具体的に説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。

【0035】実施例1

保存菌株の復元と予備培養

凍結保存したシュードモナス エスピー 31-1株（微生物研究第13280号）を室温で解凍し、1%グルコース添加ブイヨン培地に植菌して、30℃、24時間培養し復元した。この復元菌株を1%グルコース添加ブイヨン液体培地5mlに植菌し、30℃、24時間閉じ振とう培養した。

前段培養

下記に示す組成の培地を2lジャーファメンターに入れ、予備培養した前記シュードモナス エスピー 31-1株を30℃で20時間好気培養した。

【0036】

【表2】

(培地組成)

MEA Cl	0.4 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2.7 g
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	3.2 g
MgSO <sub>4</sub>	0.2 g
ミネラル溶液*	1.0 ml
蒸留水	1,000 ml
pH	7.0

【0037】

【表3】

\*:次の成分を含む

CoCl <sub>2</sub>	119.0 mg
CaCl <sub>2</sub>	7.8 mg
CrCl <sub>3</sub>	62.2 mg
FeCl <sub>3</sub> · 6H <sub>2</sub> O	9.7 mg
NiCl <sub>2</sub>	118.0 mg
CuSO <sub>4</sub>	156.0 mg
0.1N-HCl水溶液	1.0 l

(11)

特開平7-31490

20

【0038】後段培養

次に、前段培養を行った培地組成と同じ培地に炭素源としてオクタン酸ナトリウム5g/l培地を加えた培地で、30℃で30時間好気培養した。pHは無調整で7.0~7.5であった。

菌体の分離

得られた培養物から遠心分離（10,000rpm）によって、菌体を分離した。次に、得られた菌体を凍結乾燥し乾燥菌体8.0g/lを得た。

10 共重合体の分離・精製

得られた乾燥菌体にクロロホルム（ウォーターパス90℃）を加え共重合体を抽出して濃縮し、これにメタノールを加えて共重合体を沈澱させた後、上澄のメタノールを取り除き、真空乾燥機で乾燥し、乾燥菌体中88%の共重合体（1）を得た。

共重合体（1）の理化学的性質

以上のようにして得られた共重合体（1）の組成、数平均分子量、融点、ガラス転移点及び溶解性を下記により測定した。

20 【0039】

【表4】

組成：<sup>1</sup>H-NMRスペクトル、<sup>13</sup>C-NMRスペクトル

分子量：ゲルパーミエーションクロマトグラフィ（GPC）測定（日立製作所製L-6200、データ処理装置D-2520）

融点：示差走査熱量計（DSC）測定（10℃/min）（島津製作所製DSC-50）

ガラス転移点：示差走査熱量計（DSC）測定（20℃/min）

30 溶解性：各種溶剤に対する溶解性

【0040】測定結果を併せて表5に示す。乾燥菌体中の共重合体（1）は88%の高含有率であった。共重合体（1）の溶解性はクロロホルム、ジクロロメタン、1,2-ジクロロエタン、アセトンに可溶で、水に不溶であった。共重合体（1）はゴム状であった。また、100MHz <sup>13</sup>C-NMRスペクトルを図1に、500MHz <sup>1</sup>H-NMRスペクトルを図2に、GPC測定チャートを図3に、DSC測定チャートを図4に示す。

40 【0041】実施例2

後段の培養にて、炭素源としてオクタン酸ナトリウム12g/l培地とした以外は実施例1と同様に行った。

【0042】測定結果を併せて表5に示す。乾燥菌体中の共重合体（2）は93%の高含有率であった。また、共重合体（2）の溶解性はクロロホルム、ジクロロメタン、1,2-ジクロロエタン、アセトンに可溶で、水に不溶であった。共重合体（2）はゴム状であった。

【0043】実施例3

培養を前段、後段の二段階に分けることなく、実施例1の50の前段培養のときに、炭素源としてオクタン酸ナトリウ

(12)

特開平7-31490

21

ム5g/1培地を加え72時間培養し、後段培養を行わなかった以外は、実施例1と同様に行った。

【0044】測定結果を併せて表5に示す。乾燥菌体中の共重合体(3)は83%の高含有率であった。共重合体(3)の溶解性はクロロホルム、ジクロロメタン、1,2-ジクロロエタン、アセトンに可溶で、水に不溶であった。共重合体(3)はゴム状であった。

#### 【0045】実施例4

前段培養及び後段培養の培地の組成中 $\text{NH}_4\text{Cl}$ を0.5g/1培地とし、後段培養の培地に炭素源としてオクタン酸ナトリウムに変えて、グルコン酸ナトリウム15g/1培地を加えた以外は実施例1と同様に行った。

22

【0046】測定結果を併せて表5に示す。乾燥菌体中の共重合体(4)は80%の高含有率であった。共重合体(4)の溶解性はクロロホルム、ジクロロメタン、1,2-ジクロロエタン、アセトンに可溶で、水に不溶であった。共重合体(4)はドロドロした油状であった。また、100MHz  $^{13}\text{C}$ -NMRスペクトルを図5に、500MHz  $^1\text{H}$ -NMRスペクトルを図6に、GPC測定チャートを図7に、DSC測定チャートを図8に示す。

【0047】

【表5】

(13)

特開平7-31490

23

24

実施例	培 養 条 件			結 果									
	炭素源(g/l培地)		通気量 ( $\text{l}/\text{min}$ )	乾燥菌 体量 ( $\text{g}/\text{l}$ 培地)	乾燥菌 体中の 共重合 率(%)	モノマーユニット組成 (モル%)				分 子 量		融 点 ( $^{\circ}\text{C}$ )	ガラス 転移点 ( $^{\circ}\text{C}$ )
	オクタン 酸ナトリ ウム	グルコン 酸ナトリ ウム				3HHx	3HO	3HD	3HDD	数平均分 子量	重量平均 分子量		
実施例 1 (二段培養)	5.0	0	1.0	5.0	88	19	80	1	0	260,000	530,000	顯著な ピーク なし	-35
実施例 2 (二段培養)	12.0	0	1.0	10.0	93	16	82	0	2	290,000	620,000	顯著な ピーク なし	-37
実施例 3 (一段培養)	5.0	0	1.0	2.8	83	19	81	0	0	250,000	510,000	顯著な ピーク なし	-34
実施例 4 (二段培養)	0	15.0	1.0	4.5	80	7	33	40	20	110,000	250,000	顯著な ピーク なし	-44

【0048】

【発明の効果】本発明の製造方法により、乾燥菌体中80～95%を占める高含有率のモノマーユニット3HHx、3HO、3HD及び3HDDからなる共重合体を得ることができる。これにより、従来の製造方法に比し、生産コストを著しく低減せしめることが可能であり、

薬的メリットは大である。更に、本発明により得られる共重合体は医薬品、食品、衛生用品、農薬、包装材料等、広範な分野での応用が期待される。

【図面の簡単な説明】

【図1】実施例1で得られた共重合体の100MHzでの $^{13}\text{C}$ -NMRスペクトルを示す図面である。

(14)

特開平7-31490

25

26

【図2】実施例1で得られた共重合体の500MHzでの $^1\text{H}$ -NMRスペクトルを示す図面である。

【図3】実施例1で得られた共重合体のGPC測定チャートを示す図面である。

【図4】実施例1で得られた共重合体のDSC測定チャートを示す図面である。

【図5】実施例4で得られた共重合体の100MHzでの $^{13}\text{C}$ -NMRスペクトルを示す図面である。

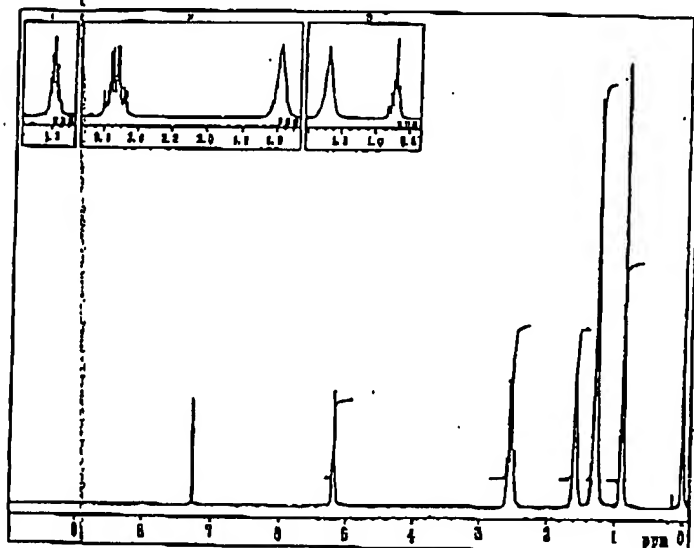
の $^{13}\text{C}$ -NMRスペクトルを示す図面である。

【図6】実施例4で得られた共重合体の400MHzでの $^1\text{H}$ -NMRスペクトルを示す図面である。

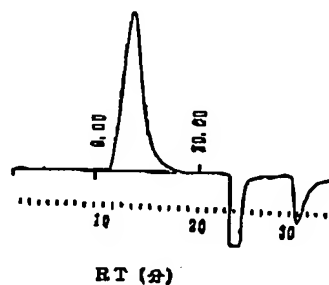
【図7】実施例4で得られた共重合体のGPC測定チャートを示す図面である。

【図8】実施例4で得られた共重合体のDSC測定チャートを示す図面である。

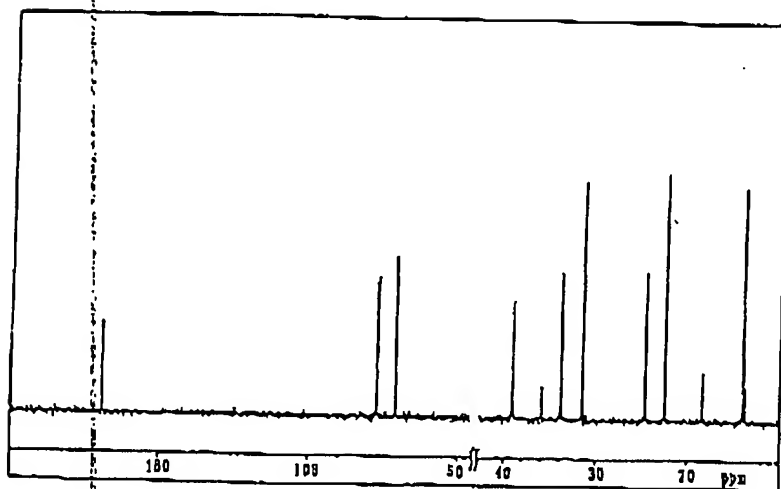
【図1】



【図3】



【図2】

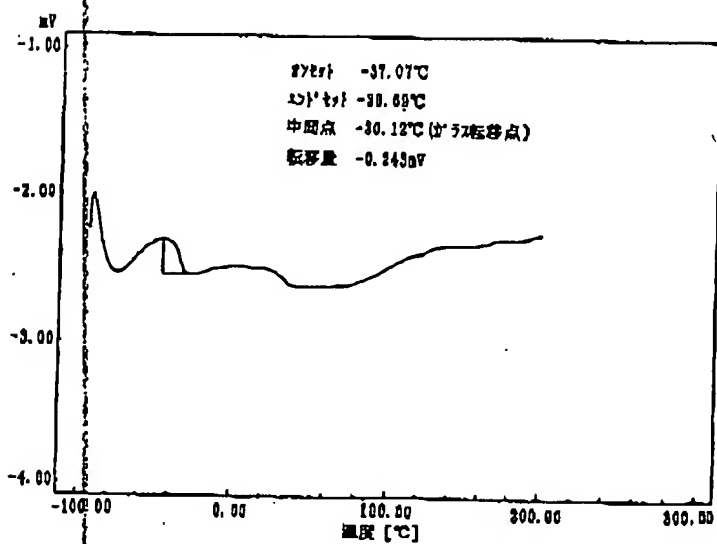




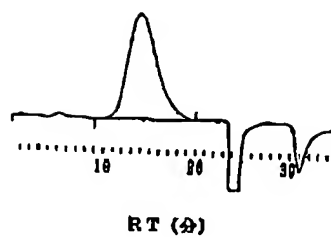
(15)

待测平7-31490

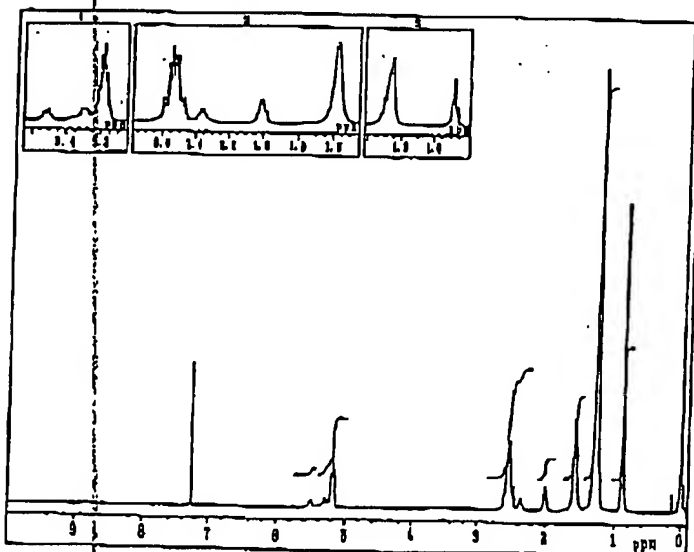
【图4】



【图7】



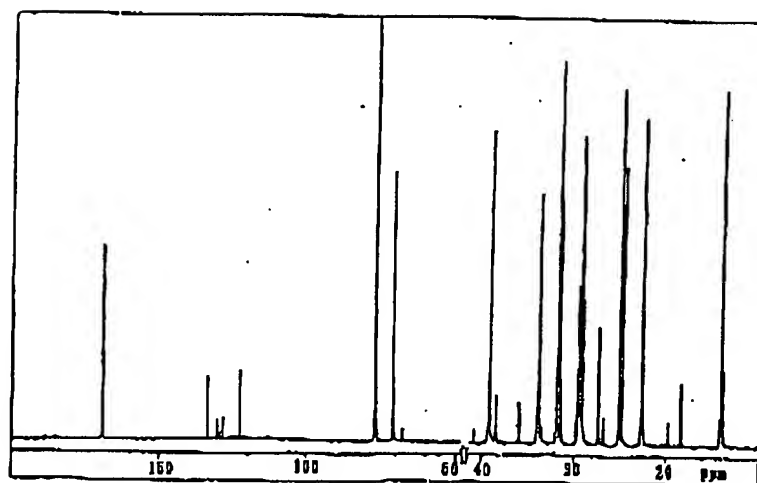
【图5】



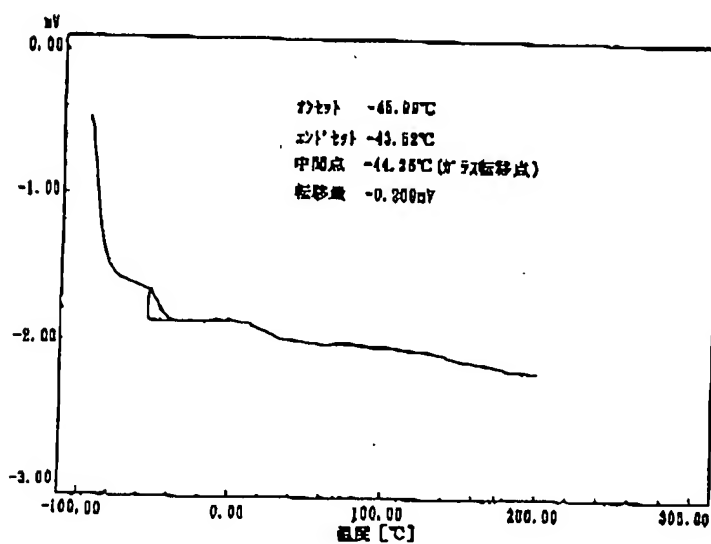
(16)

特開平7-31490

【図6】



【図8】



フロントページの続き

(51)Int.Cl.

(C12N 1/20

C12R 1:38)

識別記号

庁内整理番号

F I

技術表示箇所

(72)発明者 平野 元三

 千葉県四街道市旗の台1丁目3番 株式会  
 社日本製鋼所内

# **COPOLYMER, PRODUCTION OF THE COPOLYMER AND MICROORGANISM WHICH PRODUCES THE COPOLYMER**

Publication number: JP7082352

Publication date: 1995-03-28

Inventor: ETANI HIROSHI; FUKUSHIMA TAKESHI; IWAKI NAOKO

Applicant: JAPAN STEEL WORKS LTD

Classification:

- International: C08G63/06; C12N1/20; C12P7/62; C12R1/38; C08G63/06; C12N1/20; C12P7/62; (IPC1-7): C08G63/06; C12N1/20; C12P7/62; C12N1/20; C12R1/38; C12P7/62; C12R1/38

- European:

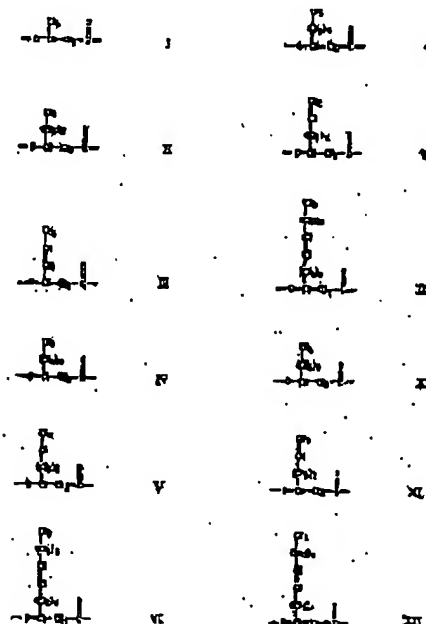
Application number: JP19930233171 19930820

Priority number(s): JP19930233171 19930820

Report a data error here

Abstract of JP7082352

**PURPOSE:** To obtain a new random copolymer comprising repeating 3- hydroxybutyrate units and repeating 3-hydroxyoctanoate units by culturing bacteria which belong to the genus *Pseudomonas* and separated from specified soil. **CONSTITUTION:** A random copolymer comprising 6-95mol% repeating 3- hydroxybutyrate units of formula I, 0-40mol% repeating 3-hydroxyhexanoate units represented by formulae II and/or III, 5-94mol% repeating 3- hydroxyoctanoate units represented by formulae IV and/or V and/or VI, 0-50mol% repeating 3-hydroxydecanoate units represented by formulae VII and/or VIII and/or IX and 0-40mol% repeating 3-hydroxydodecanoate units represented by formulae X and/or XI and/or XII is provided. This copolymer is obtained by culturing microorganisms in a medium containing a source of carbon. This microorganism is *Pseudomonas* strain SP-61-3 (FERM-P-13108).



Data supplied from the esp@cenet database - Worldwide

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平7-82352

(43) 公開日 平成7年(1995)3月28日

(51) Int.Cl. <sup>8</sup>	識別記号	庁内整理番号	FI	技術表示箇所
C 0 8 G 63/06				
C 1 2 N 1/20	A	7236-4B		
C 1 2 P 7/62		7432-4B		
// (C 1 2 N 1/20				
C 1 2 R 1:38)				

審査請求 未請求 請求項の数6 OL (全20頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願平5-233171	(71) 出願人	000004215 株式会社日本製鋼所 東京都千代田区有楽町一丁目1番2号
(22) 出願日	平成5年(1993)9月20日	(72) 発明者	恵谷 浩 千葉県四街道市鷹の台1丁目3番 株式会 社日本製鋼所内
		(72) 発明者	板島 武 千葉県四街道市鷹の台1丁目3番 株式会 社日本製鋼所内
		(72) 発明者	岩城 尚子 千葉県四街道市鷹の台1丁目3番 株式会 社日本製鋼所内
		(74) 代理人	弁理士 有賀 三幸 (外3名)

(54) 【発明の名称】 共重合体、該共重合体の製造方法及び該共重合体を生成する微生物

(57) 【要約】

【構成】 モノマー単位3HB及び3HO、さらに場合により3HHx、3HD及び/又は3HDDからなる共重合体及びその製造方法並びにそれを生成する微生物。

【効果】 医薬品、食品、衛生用品、建設用品、工業用品、農薬品、包装材料等広範な分野に応用可能である。

(2)

特開平7-82352

1

2

【特許請求の範囲】

\*び(e) ;

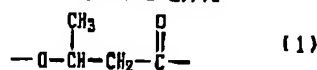
【請求項1】 下記(a)、(b)、(c)、(d)及\*

(a) 下記式(1)で表わされる3-ヒドロキシブチレート単位

【化1】

※ ※

6~95モル%

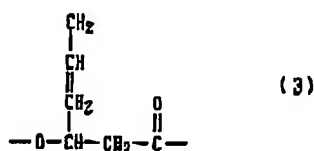
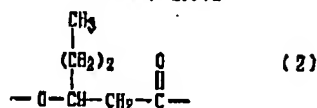


(b) 下記式(2)及び/又は(3)で表わされる3-ヒドロキシヘキサノエート単位

【化2】

★10★

0~40モル%

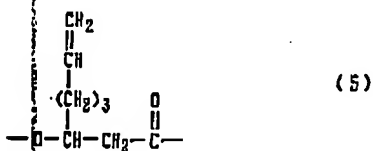
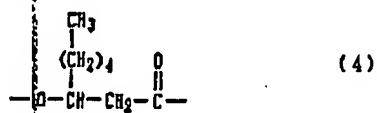


(c) 下記式(4)及び/又は(5)及び/又は(6)で表わされる3-ヒドロキシオクタノエート単位

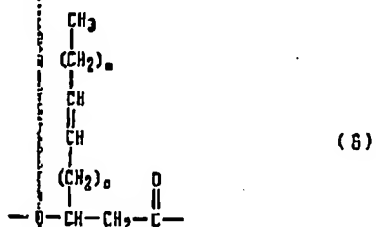
【化3】

5~94モル%

(式中、m及びnはそれぞれ0~2の整数を示し、m+n=2である。)



30



(d) 下記式(7)及び/又は(8)及び/又は(9)で表わされる3-ヒドロキシデカノエート単位

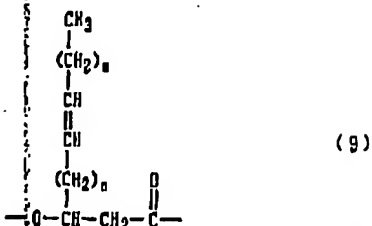
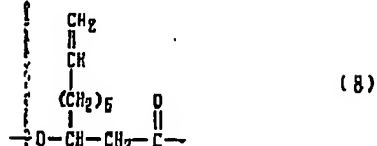
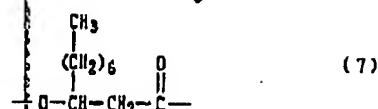
【化4】

0~50モル%

(3)

特開平7-82352

\* (式中、m及びnはそれぞれ0~4の整数を示し、m+n=4である。)

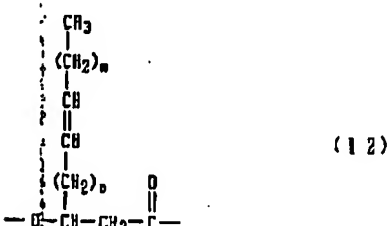
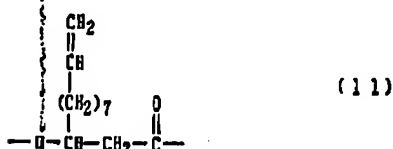


10

(e) 下記式(10)及び/又は(11)及び/又は(12)で表わされる3-ヒドロキシデカノエート単位

0~40モル%

【化5】



(式中、m及びnはそれぞれ0~6の整数を示し、m+n=6である。)からなるランダム共重合体。

【請求項2】 微生物を、炭素源を含有する培地で培養する工程を含むことを特徴とする請求項1記載のランダム共重合体の製造方法。

【請求項3】 微生物を、炭素源を含有する培地で培養する工程を含み、請求項1記載のランダム共重合体(A)を乾燥菌体中に5~95%及び請求項1記載の式(1)で表わされる3-ヒドロキシブチレート単位からなる重合体(B)を乾燥菌体中に0~95%(但し、A+Bは5~95%である)同時に生成することを特徴とする重合体の製造方法。

【請求項4】 請求項1記載のランダム共重合体を生成し

20 得るシュードモナスエスピー(Pseudomonas sp.) 61-3株(微工研菌寄第13108号)。

【請求項5】 微生物が請求項4記載のシュードモナスエスピー61-3株である請求項2記載のランダム共重合体の製造方法。

【請求項6】 微生物が請求項4記載のシュードモナスエスピー61-3株である請求項3記載の重合体の製造方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

30 【産業上の利用分野】 本発明は、医薬品、食品、衛生用品、建設用品、工業用品、農薬用品、包装材料等広範な分野に应用可能な生分解性のランダム共重合体、該ランダム共重合体の製造方法及び該ランダム共重合体を生成する微生物に関する。

【0002】

【従来の技術】 微生物の多くは、各種の共重合体を合成することが知られている。それらの共重合体は熱可塑性を有する、いわゆるプラスチックから、粘弾性を有するゴム状のものまで、多岐にわたっており、しかも、これらはいずれも生分解性を有するものである。

【0003】 例えば、近年、エネルギー貯蔵物質として注目されている3-ヒドロキシブチレート(3HB・炭素数4)の重合体ポリ-3-ヒドロキシブチレート(P(3HB))については特開昭56-117793号、同57-74084号、同57-150393号等に、3-ヒドロキシブチレートと3-ヒドロキシバヒレート(3HV・炭素数5)の共重合体(P(3HB-co-3HV))については特開昭57-150393号、同58-69224号、同58-212792号、同59-220192号、同59-205992号、同61-

(4)

特開平7-82352

5

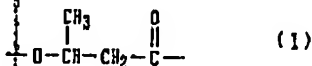
293385号、同63-269989号、特開平5-7492号等に、3-ヒドロキシブチレートと4-ヒドロキシブチレート(4HB、炭素数4)の共重合体[P(3HB-co-4HB)]については特開平1-48821号、同1-156320号、同1-222788号、同1-304891号、同2-27992号、同2-234583号、同3-216193号、同5-23189号等に、3-ヒドロキシブチレートと3-ヒドロキシバレートと4-ヒドロキシバレート(4HV、炭素数5)の共重合体[P(3HB-co-3HV-co-4HV)]については特開平5-32768号にそれぞれ共重合体及びその製造方法が開示されている。

【0004】一方、R. Clinton FullerらのApplied and Environmental Microbiology, Vol. 54, No. 8, p1977-1982(1988)には、例えば3-ヒドロキシヘキサノエート(3HHx、炭素数6)と3-ヒドロキシオクタノエート(3HO、炭素数8)と3-ヒドロキシデカノエート(3HD、炭素数10)の共重合体[P(3HHx-co-3HO-co-3HD)]など炭素数6~11の単位組成からなり、炭素数4の3HB単位を持たない共重合体がシュードモナス・オレオボランスATCC29347によって合成されることが報告されている。

【0005】さらに、A. SteinbuchelらのApplied and Environmental Microbiology, Vol. 56, No. 1, p3360-3367(1990)には、例えばシュードモナス・セバシアDSM50181等によってP(3HB)が合成されることが、シュードモナス・アルギノサDSM288及びシュードモナス・フローレンセンDSM50090等によってP(3HHx-co-3HO-co-3HD-co-3HDD)、シュードモナス・オーレオファセンDSM50082及びシュードモナス・フローレンセンDSM50090等によってP(3HHx-co-3HO)、シュードモナス・シトロネロリスDSM50332によってP(3HO-co-3HD)、シュードモナス・ファシリDSM550によってP(3HO-co-3HD-co-3HDD)\*

(a) 下記式(1)で表わされる3-ヒドロキシブチレート(3HB)単位  
6~95モル%

【0012】  
【化6】



(b) 下記式(2)及び/又は(3)で表わされる3-ヒドロキシヘキサノエート(3HHx)単位  
0~40モル%

【0014】  
【化7】

6

\*が合成されることが報告されている。

【0006】以上の重合体はいずれも炭素数4の単位からなる重合体、炭素数4の単位と炭素数5の単位とからなる共重合体、炭素数4の単位と炭素数4の単位とからなる共重合体、あるいは炭素数6~12の単位からなる共重合体である。炭素数4の単位と炭素数6~12の単位とからなるランダム共重合体は未だ見出されていない。

【0007】これら生分解性の共重合体は加水分解性を有し、土中や河川水中、海水中、生体内の微生物の作用で二酸化炭素と水に分解され自然環境に戻るものであり、近年、地球環境保全に対する意識の高まりから注目され、研究開発がなされ、実用化が検討されている。

【0008】

【発明が解決しようとする課題】しかしながら、微生物が生成する共重合体は、その理化学的性質が多岐にわたっており、それぞれの使用目的に適合する共重合体の探索が要求されている。

【0009】一方、共重合体の微生物による生産は、通常の化学合成法による生産に比較して、培地成分が高価である、微生物の共重合体生成速度が遅く、かつ生成効率が低い、さらに菌体中の共重合体含有率が低い等のため生産コストが高くなるという欠点を有しており、この問題の解決が望まれていた。

【0010】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、かかる実情に鑑み鋭意検討した結果、千葉県佐倉市の土壌より分離したシュードモナス属に属する細菌を培養すれば、これまでにない新規なランダム共重合体である炭素数4の3HBと炭素数8の3HO、さらに所望により、炭素数6、10、12の3HHx、3HD及び/又は3HDDの単位からなるランダム共重合体P(3HB-co-3HHx-co-3HO-co-3HD-co-3HDD)及び、場合により、炭素数4の3HBの単位からなる重合体P(3HB)を同時に生成し得ることを見出し、本発明を完成するに至った。

【0011】すなわち、本発明は、第一に、下記(a)、(b)、(c)、(d)及び(e)：

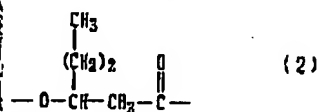
【0013】

(5)

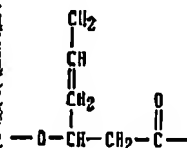
特開平7-82352

\* [0015]

7



(3)



\* 10

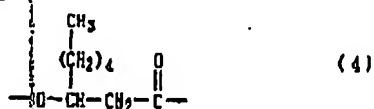
(c) 下記式 (4) 及び/又は (5) 及び/又は (6) で表わされる3-ヒドロキシオクタノエート (3HO) 単位 5~94モル%

[0016]

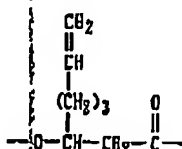
[化8]

※ [0017] (式中、m及びnはそれぞれ0~2の整数を示し、m+n=2である。)

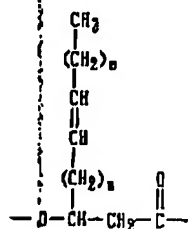
[0018]



(5)



(6)



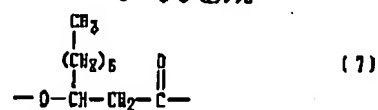
30

※

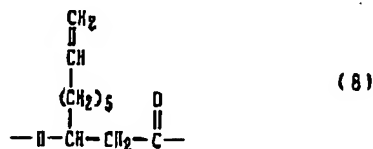
(d) 下記式 (7) 及び/又は (8) 及び/又は (9) で表わされる3-ヒドロキシデカノエート (3HD) 単位 0~50モル%

[0019]

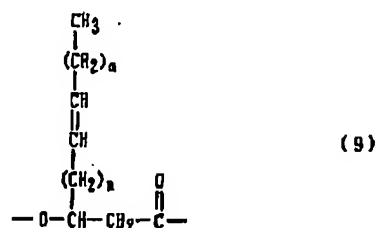
[化9]



(7)



(8)



(9)

50



(6)

特開平7-82352

9

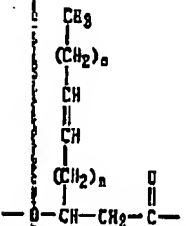
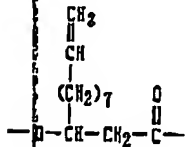
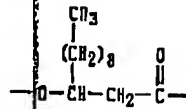
10

【0020】(式中、m及びnはそれぞれ0～4の整数を示し、 $m+n=4$ である。) \* 【0021】

(e) 下記式(10)及び/又は(11)及び/又は(12)で表わされる3-ヒドロキシデカノエート(3HDD)単位 0～40モル%

【0022】

【化10】



【0023】(式中、m及びnはそれぞれ0～6の整数を示し、 $m+n=6$ である。)からなるランダム共重合体を提供するものである。

【0024】本発明は、第二に、微生物を、炭素源を含有する培地で培養する工程を含むことを特徴とする上記ランダム共重合体の製造方法を提供するものである。

【0025】本発明は、第三に、上記ランダム共重合体を生成し得るシュードモナス エスピー(Pseudomonas sp.) 61-3株(微生物研第13108号)を提供するものである。

【0026】本発明のランダム共重合体は3HB及び3HO、さらに場合により3HHx、3HD及び/又は3HDDのそれぞれのモノマー単位が前記特定割合でエステル結合したものである。

【0027】本発明のランダム共重合体を製造する方法は、炭素源を含有する培地に微生物を接種し、培養し、この培養物よりランダム共重合体を採取するものである。ここで、本発明に使用される微生物は、上記ランダム共重合体生産能を有するものであれば特に限定されないが、以下の菌学的性質を有するものである。

【0028】(1) 形態学的性質

寒天培地、30℃、一夜培養で0.8～1.1μm×1.7～3.2μmの直状桿菌である。液体培地でも寒天培地での形態とほぼ同様である。べん毛染色で極毛が観察され、運動性が認められる。多形性、孢子、グラム染色性及び抗酸性は認められない。

【0029】(2) 各種培地における生育状態

(イ) 肉汁寒天平板培地

コロニーは平滑で周縁はなめらかである。特徴的コロニー色素、拡散性色素の産生は認められない。

(ロ) 肉汁寒天斜面培地

菌苔は平滑で周縁はなめらかである。特徴的コロニー色素、拡散性色素の産生は認められない。

(ハ) 肉汁液体培地

培地表面での生育及び皮膜の形成が認められる。

(ニ) 肉汁ゼラチン穿刺培養

培地の上部に生育が認められるが、液化は認められない。

(ホ) リトマスミルク

アルカリの産生は認められるが、凝固は認められない。

【0030】(3) 生理的性質

(イ) 硝酸塩の還元 : 陽性

(ロ) 脱窒反応 : 陽性

(ハ) MRテスト : 陰性

(ニ) VPテスト : 陰性

(ホ) インドールの生成 : 陰性

(ヘ) 硫化水素の生成

TSI寒天 : 陰性

酢酸鉛寒天 : 陰性

(ト) デンプンの加水分解 : 陰性

(チ) ケエン酸の利用

Koserの培地 : 陽性

Christensenの培地 : 陽性

(リ) 無機窒素源の利用

硝酸塩 : 陽性

アンモニウム塩 : 陽性

(ヌ) 色素の生成

コロニー : 陰性

水溶性 : 微弱

(ル) ウレアーゼ : 陰性

(ヲ) オキシダーゼ : 陽性

(ワ) カタラーゼ : 陽性

(カ) 生育の範囲

pH : 5.5～8.5

温度 : -2～33℃

(ヨ) 酸素に対する態度 : 好気性

(タ) O-Fテスト(Hugh Leifson法) : O

(レ) グルコン酸からのP(3HB-co-3HHx, 3HO, 3HD, 3HDD)産生 : 陽性

(ソ) オクタン酸からのP(3HB-co-3HHx, 3HO)産生 : 陽性

(7)

特開平7-82352

11

12

(ツ) 糖類からの酸及びガスの生成：下記表1に記載  
【0032】

\*【表1】

\*

糖 類	酸の生成	ガスの生成
L-アラビノース	陰 性	陰 性
D-キシロース	陰 性	陰 性
D-グルコース	陽 性	陰 性
D-マンノース	陽 性	陰 性
D-フラクトース	陽 性	陰 性
D-ガラクトース	陰 性	陰 性
麦芽糖	陰 性	陰 性
ショ糖	陰 性	陰 性
乳 糖	陰 性	陰 性
トレハロース	陽 性	陰 性
D-ソルビット	陽 性	陰 性
D-マンニット	陽 性	陰 性
イノシット	陽 性	陰 性
グリセリン	陽 性	陰 性
デンプン	陰 性	陰 性

【0032】以上の菌学的性質から、この微生物はシュードモナス属に属する菌であり、さらに公知の菌株と比較しても同じものが存しないため新規の菌株と判断し、シュードモナス エスピー (Pseudomonas sp.) 61-3と命名して、工業技術院微生物工業技術研究所は微工研菌寄第13108号 (FERM P-13108) として寄託した。

【0033】本発明の微生物は自然又は紫外線、X線、化学薬剤等により変異を起す。従って、本発明の共重合体の製造方法には、これら変異株を用いることもできる。

【0034】本発明のランダム共重合体の製造方法において使用される培地には、資化し得る炭素源の他、所望により窒素源及びその他の栄養源を適量含有せしめておく。これらは特に制限はないが、具体的には炭素源としてはオクタン酸、グルコン酸、吉草酸もしくはそれらのナトリウム塩、グルコサミン、ブイオン、シュクロース、デンプン、糖蜜、アラビノース、ソルビトール、メタノール、エタノール、二酸化炭素、オレイン酸、パルミチン酸、リノール酸、ステアリン酸、リノレン酸等の脂肪酸、さらに天然油脂であるコーン油、オリーブ油、

大豆油、なたね油等の植物油や魚油、豚脂、牛脂等の動物油等が挙げられ、窒素源としては塩化アンモニウム、硫酸アンモニウム、硝酸ナトリウムなどの無機窒素源の他、酵母エキス、肉エキス、ペプトン、トリプトン、尿素、大豆粉、油粕などの有機窒素源も挙げることができ、その他の添加物としては、必要に応じてマグネシウム、ナトリウム、カリウム、カルシウム、マンガン、銅、モリブデン、亜鉛、鉄等の金属塩、リン酸塩、硝酸塩、塩化物、炭酸塩等、クエン酸ナトリウム等の有機酸塩、さらに必要に応じてビタミン等の発育素が挙げられる。

【0035】培養は好気的条件下で行うのが好ましく、静置、振とう、通気攪拌培養のいずれも可能であるが、振とうあるいは通気攪拌培養が有利である。このとき、培養方式は回分培養、連続培養のいずれであってもよい。培養温度は約10～33℃が好ましく、特に約20～30℃が好適である。また、培地のpHは約5.5～8.5が適当であるが、特に6.0～8.0が最適である。

【0036】また、このとき主として菌体を増殖させる前段の培養と、窒素及び/又はリンを制限して菌体内に

13

共重合体を合成、蓄積させる後段の培養との二段階により培養したほうが、通常、共重合体の生成量が多くなるため好ましい。すなわち、上記の培養条件で前段の培養を行い、得られた培養液から菌体を濾過あるいは遠心分離のような手段で分離回収し、その菌体を後段の窒素及び／又はリンを制限した培地での培養に移行させるか、又は、前段の培養において窒素及び／又はリンを枯渇させ、菌体を分離回収することなく、その培養液を後段の培養に移行させてもよい。この後段の培養は培養液中に窒素及び／又はリンを実質的に含有させない点でのみ前段の培養と異なる。

【0037】以上の培養において、後段の培養における培養条件が重要である。後段における培養液中の炭素源は共重合体合成の原料であり、通常、この炭素源の構造がランダム共重合体の構造を決定する場合が多い。例えば、炭素数6のグルコン酸ナトリウムを炭素源として培養すると、炭素数4の3HB、炭素数8の3HO及び炭素数10の3HD単位が比較的高モル%となっているランダム共重合体を合成し、炭素数8のオクタン酸ナトリウムを炭素源として培養すると炭素数8の3HO及び炭素数6の3HHx単位が比較的高モル%となっているランダム共重合体を合成する。また、二重結合を有する炭素源で培養すると、側鎖に二重結合を含んだ不飽和単位を有するランダム共重合体が通常得られる。さらに、二重結合を有しない炭素源で培養した場合でも、炭素数12の3HDD単位の側鎖には二重結合を含むことがある。

【0038】これらの炭素源の量は、共重合体を合成することができ、かつ、微生物の生育を阻害しない量であればよいが、共重合体を構成するモノマー単位の種類あるいはモノマー単位数の割合により変化させることが好ましい。通常は培養液1lあたり0.1~100g程度、好ましくは0.5~30g程度である。

【0039】上記により培養された培養物中から、濾過あるいは遠心分離などの通常の手段によって菌体を分離回収し、その菌体を洗浄、乾燥して乾燥菌体を得る。菌体の収量は0.5~8g/l程度である。この菌体から目的のランダム共重合体を採取するには、常法により、例えばクロロホルムのような有機溶剤で生成した共重合体を抽出し、例えば共重合体を溶解しにくいメタノール、ヘキサンなどの貧溶媒を加えて上記共重合体を沈澱させる。

【0040】乾燥菌体中には上記ランダム共重合体P(3HB-co-3HHx-co-3HO-co-3HD-co-3HDD)(A)5~95%に加え重合体P(3HB)(B)0~95%が含まれ(A+Bは5~95%である)、これを分別したい場合には、例えばアセトンを用いれば共重合体(A)は可溶抽出、一方、重合体(B)は沈澱される。

【0041】上記重合体(B)の含有量は、炭素源の種

(8)

特開平7-82352

14

類、濃度及び窒素源その他の栄養源の種類、濃度等を変えて培養することにより調節できる。

【0042】かくして3HB及び3HO、さらに場合により3HHx、3HD及び／又は3HDDのモノマー単位がエステル結合したランダム共重合体得られ、また、上記培養条件により3HB単位がエステル結合した重合体も同時に得られる。各モノマー単位の割合及び分子量は、オクタン酸、グルコン酸などの炭素源の種類や濃度を変えることによって、制御することができる。

【0043】

【実施例】以下に本発明を実施例により具体的に説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。

【0044】実施例1

保存菌株の復元と予備培養

スクリーニングした菌株のうち、千葉県佐倉市の土壌より分離したシュードモナス エスピー61-3株(微工研菌第13108号)を凍結保存から、37℃で解冻し、1%グルコース添加ブイヨン寒天培地に植菌して、30℃、24時間培養し復元した。この復元菌株を1%グルコース添加ブイヨン液体培地5mlに植菌し、30℃、24時間往復振とう培養した。

【0045】前段培養

下記に示す組成の培地2lをジャーファメンターに入れ、予備培養した前記シュードモナス エスピー61-3株をジャーファメンターの攪拌速度250rpm、空気通気量10l/hとし、30℃で30時間好気培養した。

【0046】

【表2】(培地組成)

NH <sub>4</sub> Cl	0.4g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2.7g
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	3.2g
MgSO <sub>4</sub>	0.2g
ミネラル溶液	1.0ml
蒸留水	1,000ml
pH	7.0

【0047】

【表3】\*:次の成分を含む

CoCl <sub>2</sub>	119.0mg
CaCl <sub>2</sub>	7.8mg
CrCl <sub>3</sub>	62.2mg
FeCl <sub>3</sub> ・6H <sub>2</sub> O	9.7mg
NiCl <sub>2</sub>	118.0mg
CuSO <sub>4</sub>	156.0mg
0.1N-HCl水溶液	1.0l

【0048】後段培養

次に、前段培養を行った培地組成のうちNH<sub>4</sub>Clを無しとし、グルコン酸ナトリウム20g/lを加えた培地を2lジャーファメンターに入れ、前段培養で得られた菌体を10g懸濁させ、ジャーファメンターの攪拌速度

特開平7-82352

16

(島津製作所製DSC-50)

ガラス転移点：示差走査熱量計 (DSC) 測定 (20℃ / min)

**溶解性** : 各種溶剤に対する溶解性

【0050】測定結果を併せて表7に示す。重合体

(1) は新規なランダム共重合体P (3HB-co-3HHx-co-3HO-co-3HD-co-3HD) であった。このとき、3HDDには側鎖に二重結合があるものもあった。溶解性はクロロホルム、ジクロロメタン、1, 2-ジクロロエタン、アセトンに可溶で、水に不溶であった。ランダム共重合体(1)はクロロホルム溶融キャスト法でフィルムに成形すると、かなり軟らかいプラスチックになった。重合体(2)はP (3HB) であり、クロロホルム、ジクロロメタン、1, 2-ジクロロエタンに可溶で、アセトン、水に不溶であった。

【0051】それぞれの重合体のGC測定チャートを図1及び図2に、 $^{100}\text{MHz}$   $^{13}\text{C}$ -NMRスペクトルを図3及び図4に、GPC測定チャートを図5及び図6に、DSC測定チャートを図7（融点）並びに図8及び図9（ガラス転移点）に示す。

ソックスレー抽出装置を用いて、この生成物にアセトン（ウォーターバス 80℃）を加えアセトン可溶部を抽出して過剰し、真空乾燥機で乾燥し、ランダム共重合体（1）0.84 g/l を得た。また、アセトン不溶部を乾燥し重合体（2）0.56 g/l を得た。

### 重合体 (1) 及び (2) の理化学的性質

以上のようにして得られた重合体(1)及び(2)の構造・組成、数平均分子量、融点、ガラス転移点及び溶解性を下記により測定した。

【0049】

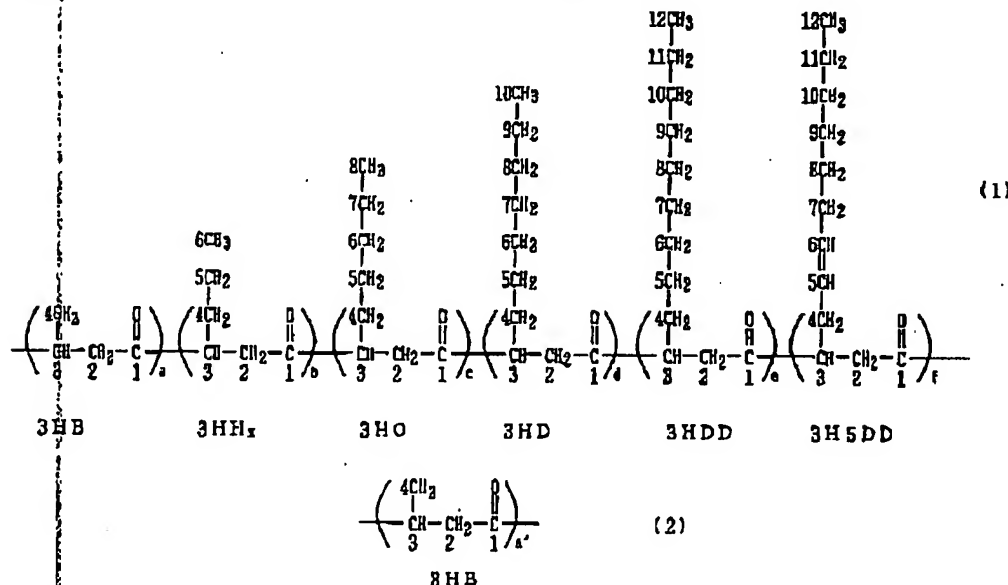
【表4】単位組成：ガスクロマトグラフィ（GC）測定  
（日立製作所製G-3000，カラム：NEUTRA  
BOND-1）

構造  $^{13}\text{C}$ -NMRスペクトル (日本分光工業製)

分子量 : ゲルパーミエーションクロマトグラフィ (G 30 PC) 測定

**【0053】**

【化 1 1】



(10)

特開平7-82352

17

18

## 【0054】実施例2

保存菌株の復元と予備培養、前段培養は実施例1と同様に行った。

## 前段培養

前段培養を行った培地組成のうち $\text{NH}_4\text{Cl}$ を無しとし、オクタン酸ナトリウム $1\text{g/l}$ を加えた培地を21ジャーファメンターに入れ、前段培養で得られた菌体 $10\text{g/l}$ 懸濁させ、ジャーファメンターの撹拌速度 $250\text{rpm}$ 、空気通気量 $5\text{l/h}$ とし、 $30^\circ\text{C}$ で12時間好気培養した。pHは無調整で $7.0\sim 7.5$ であった。

## 菌の分離

得られた培養物から遠心分離( $10,000\text{rpm}$ )によって、菌体を分離した。次に、得られた菌体を凍結乾燥し乾燥菌体 $1.5\text{g/l}$ を得た。

## 合成物の分離・精製

ソックスレー抽出装置を用いて、得られた乾燥菌体にクロロホルム(ウォーターバス $90^\circ\text{C}$ )を加え合成物を抽出して濃縮し、これにメタノールを加えて合成物を沈澱させた後、上澄のメタノールを取り除き、真空乾燥機で乾燥し、 $0.90\text{g/l}$ (乾燥菌体中 $60\%$ )の合成物を得た。

## 重合体の分別

ソックスレー抽出装置を用いて、合成物にアセトン(ウォーターバス $80^\circ\text{C}$ )を加えてアセトン可溶部を抽出して濃縮し、真空乾燥機で乾燥し、ランダム共重合体(3) $0.64\text{g/l}$ を得た。また、アセトン不溶部を乾燥し重合体(4) $0.26\text{g/l}$ を得た。

## 重合体(3)及び(4)の理化学的性質

実施例1と同様に行った。測定結果を併せて表7に示す。重合体(3)は新規なランダム共重合体P( $3\text{HB}-\text{co}-3\text{HHx}-\text{co}-3\text{HO}-\text{co}-3\text{HD}$ )であった。溶解性はクロロホルム、ジクロロメタン、1,2-ジクロロエタン、アセトンに可溶で、水に不溶であった。ランダム共重合体(3)は粘度の高い油状でドロドロとした性状を呈していた。重合体(4)はP( $3\text{HB}$ )であり、クロロホルム、ジクロロメタン、1,2-ジクロロエタンに可溶で、アセトン、水に不溶であった。また、GC測定チャートを図10及び図11に、GPC測定チャートを図12及び図13に、DSC測定チャートを図14及び図15(融点)並びに図16及び図17(ガラス転移点)に示す。

## 【0055】実施例3

保存菌株の復元と予備培養は実施例1と同様に行った。

## 本培養(1段培養)

下記に示す組成の培地 $100\text{ml}$ を三角フラスコに入れ、予備培養した前記シュードモナス エスピー61-3株を往復振とう数 $130\text{rpm}$ で、 $30^\circ\text{C}$ 、60時間好気培養した。

## 【0056】

【表5】(培地組成)

グルコン酸ナトリウム	18.0g
$\text{NH}_4\text{Cl}$	0.4g
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	2.7g
$\text{NaH}_2\text{PO}_4$	3.2g
$\text{MgSO}_4$	0.2g
ミネラル溶液*	1.0ml
蒸留水	1,000ml
pH	7.0

## 【0057】

【表6】\*:次の成分を含む

$\text{CoCl}_2$	119.0mg
$\text{CaCl}_2$	7.8mg
$\text{CrCl}_3$	62.2mg
$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	9.7mg
$\text{NiCl}_2$	118.0mg
$\text{CuSO}_4$	156.0mg
$0.1\text{N-HCl}$ 水溶液	1.0l

## 【0058】菌の分離、合成物の分離・精製、重合体の分別

実施例1及び2と同様に行った。その結果、乾燥菌体 $2.0\text{g/l}$ から合成物 $0.66\text{g/l}$ (乾燥菌体中 $33\%$ )を得た。この合成物はランダム共重合体(5) $0.47\text{g/l}$ と重合体(6) $0.19\text{g/l}$ に分別された。

## 重合体(5)及び(6)の理化学的性質

実施例1と同様に行なった。測定結果を併せて表7に示す。重合体(5)は新規なランダム共重合体P( $3\text{HB}-\text{co}-3\text{HHx}-\text{co}-3\text{HO}-\text{co}-3\text{HD}-\text{co}-3\text{HDD}$ )であった。このとき、 $3\text{HDD}$ には側鎖に二重結合があるものもあった。溶解性はクロロホルム、ジクロロメタン、1,2-ジクロロエタン、アセトンに可溶で、水に不溶であった。ランダム共重合体(5)は粘度の高い油状でゴム状に近いものであった。重合体(6)はP( $3\text{HB}$ )であり、クロロホルム、ジクロロメタン、1,2-ジクロロエタンに可溶で、アセトン、水に不溶であった。また、GC測定チャートを図18及び図19に、 $100\text{MHz}$   $^{13}\text{C}$ -NMRスペクトルを図20及び図21に示す。

【0059】なお、共重合体(5)の化学式は前記共重合体(1)のそれと同様であり、各モノマーの存在量比率が異なっていた。また、重合体(6)の化学式は前記重合体(2)のそれと同様であった。

## 【0060】実施例4

保存菌株の復元と予備培養は実施例1と同様に行った。

## 本培養(1段培養)

実施例3の本培養に用いた培地組成のうち、グルコン酸ナトリウムを無しとし、グルコサミン $25\text{g/l}$ を加えた培地 $100\text{ml}$ を三角フラスコに入れ、予備培養したシュードモナス エスピー61-3株を往復振とう数 $90\text{rpm}$ で、 $30^\circ\text{C}$ 、80時間好気培養した。

19

菌の分離・合成物の分離・精製・重合体の分別

実施例1及び2と同様に行った。その結果、乾燥菌体1.8g/lから合成物0.54g/l(乾燥菌体中30%)を得た。この合成物からは分別されず、ランダム共重合体(7)0.54g/lのみを得た。

重合体(7)の理化学的性質

実施例1と同様に行った。測定結果を併せて表7に示す。重合体(7)は新規なランダム共重合体P(3HB-co-3HHx-co-3HO-co-3HD-co-3HDD)であった。溶解性はクロロホルム、アセトンに可溶で、水に不溶であった。ランダム共重合体(7)は粘度の高い油様でドロドロとした性状を呈していた。

【0061】実施例5

保存菌株の復元と予備培養は実施例1と同様に行った。

本培養(1段培養)

実施例3の本培養に用いた培地組成のうち、グルコン酸ナトリウムを無しとし、オクタン酸ナトリウム1.0g/lを加え、NH<sub>4</sub>Clの量0.4g/lを0.04g/lに変えた培地100mlを三角フラスコに入れ、予備培養したシュードモナス エスピー-61-3株を往復振とう数130rpmで、30℃、48時間好気培養した。

菌の分離・合成物の分離・精製・重合体の分別

実施例1及び2と同様に行った。その結果、乾燥菌体1.4g/lから合成物0.78g/l(乾燥菌体中56%)を得た。この合成物はランダム共重合体(8)0.53g/lと重合体(9)0.25g/lに分別された。

重合体(8)及び(9)の理化学的性質

実施例1と同様にして行った。測定結果を併せて表7に示す。重合体(8)は新規なランダム共重合体P(3HB-co-3HHx-co-3HO)であった。溶解性はクロロホルム、アセトンに可溶で、水に不溶であっ

(11)

特開平7-82352

20

た。ランダム共重合体(8)は粘度の低い油様であった。重合体(9)は共重合体P(3HB-co-3HHx-co-3HO)であった。溶解性はクロロホルムに可溶で、アセトン、水に不溶であった。共重合体(9)はクロロホルム溶解キャスト法でフィルムに成形すると、硬くてもろいプラスチックになった。また、GC測定チャートを図22及び図23に示す。

【0062】実施例6

保存菌株の復元と予備培養は実施例1と同様に行った。

本培養(1段培養)

実施例3の本培養に用いた培地組成のうち、グルコン酸ナトリウムを無しとし、百草酸ナトリウム1.0g/lを加えた培地100mlを三角フラスコに入れ、予備培養したシュードモナス エスピー-61-3株を往復振とう数180rpmで、30℃、70時間好気培養した。

菌の分離・合成物の分離・精製・重合体の分別

実施例1及び2と同様に行った。その結果、乾燥菌体0.9g/lから合成物0.08g/l(乾燥菌体中9%)を得た。この合成物は共重合体(10)0.03g/lと重合体(11)0.05g/lに分別された。

重合体(10)及び(11)の理化学的性質

実施例1と同様に行った。測定結果を併せて表7に示す。重合体(10)は新規なランダム共重合体P(3HB-co-3HO-co-3HD-co-3HDD)であった。このとき、3HDDには側鎖に二重結合があるものもあった。溶解性はクロロホルム、アセトンに可溶で、水に不溶であった。ランダム共重合体(10)はクロロホルム溶解キャスト法でフィルムに成形すると、やや軟らかいプラスチックになった。重合体(11)はP(3HB)であり、クロロホルムに可溶で、アセトン、水に不溶であった。

【0063】【表7】

(12)

特開平7-82352

21

22

結果

培養条件

実施例

1

2

3

4

5

6

7

8

9

10

11

12

13

14

15

16

17

18

19

20

21

22

23

24

25

26

27

28

29

30

31

32

33

34

35

36

37

38

39

40

41

42

43

44

45

46

47

48

49

50

51

52

53

54

55

56

57

58

59

60

61

62

63

64

65

66

67

68

69

70

71

72

73

74

75

76

77

78

79

80

81

82

83

84

85

86

87

88

89

90

91

92

93

94

95

96

97

98

99

100

101

102

103

104

105

106

107

108

109

110

111

112

113

114

115

116

117

118

119

120

121

122

123

124

125

126

127

128

129

130

131

132

133

134

135

136

137

138

139

140

141

142

143

144

145

146

147

148

149

150

151

152

153

154

155

156

157

158

159

160

161

162

163

164

165

166

167

168

169

170

171

172

173

174

175

176

177

178

179

180

181

182

183

184

185

186

187

188

189

190

191

192

193

194

195

196

197

198

199

200

201

202

203

204

205

206

207

208

209

210

211

212

213

214

215

216

217

218

219

220

221

222

223

224

225

226

227

228

229

230

231

232

233

234

235

236

237

238

239

240

241

242

243

244

245

246

247

248

249

250

251

252

253

254

255

256

257

258

259

260

261

262

263

264

265

266

267

268

269

270

271

272

273

274

275

276

277

278

279

280

281

282

283

284

285

286

287

288

289

290

291

292

293

294

295

296

297

298

299

300

301

302

303

304

305

306

307

308

309

310

311

312

313

314

315

316

317

318

319

320

321

322

323

324

325

326

327

328

329

330

331

332

333

334

335

336

337

338

339

340

341

342

343

344

345

346

347

348

349

350

351

352

353

354

355

356

357

358

359

360

361

362

363

364

365

366

367

368

369

370

371

372

373

374

375

376

377

378

379

380

381

382

383

384

385

【0064】

【発明の効果】本発明の共重合体及び本発明の微生物を用いる該共重合体の製造方法により、モノマー単位3HB、3HHx、3HO、3HD及び3HDDからなる新規なランダム共重合体を得ることができる。これによ

り、従来の共重合体に比し、理化学的性質の異った、優れたランダム共重合体を生産することが可能であり、産業上の利用価値が大である。さらに、本発明により得られるランダム共重合体は医薬品、食品、衛生用品、建設用品、工業用品、農薬品、包装材料等広範な分野での

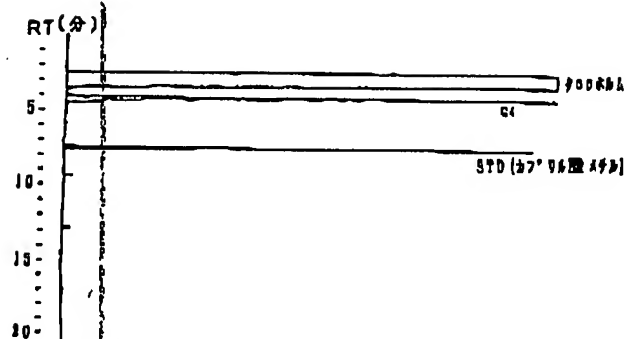




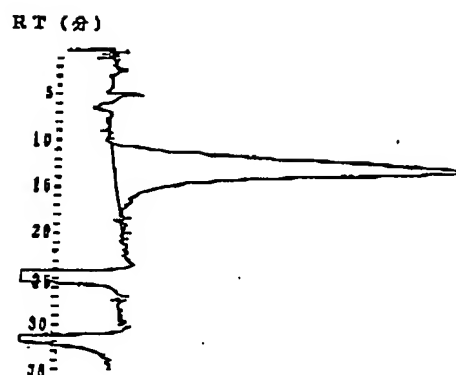
(14)

特開平7-82352

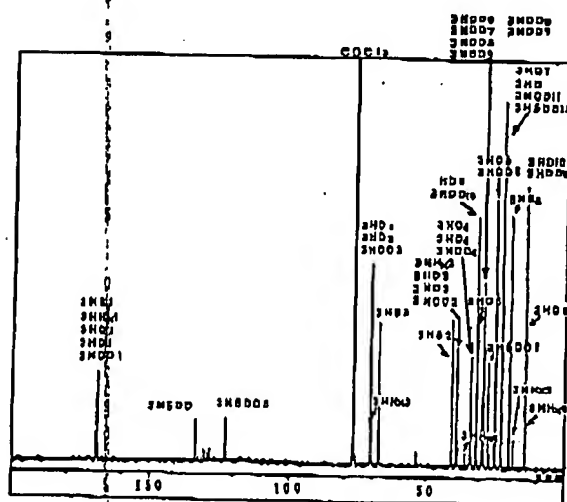
【図2】



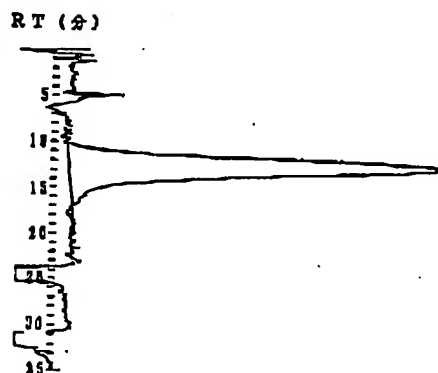
【図6】



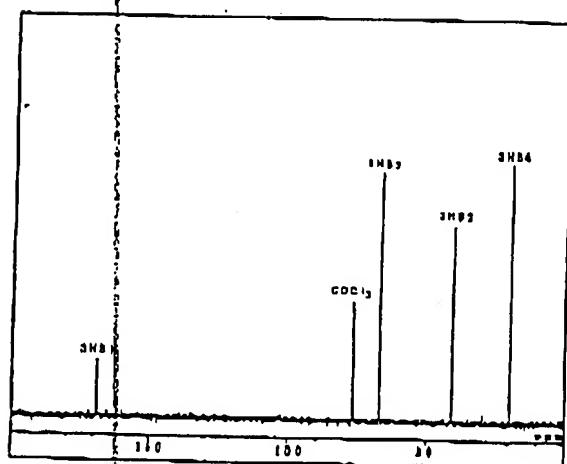
【図3】



【図13】



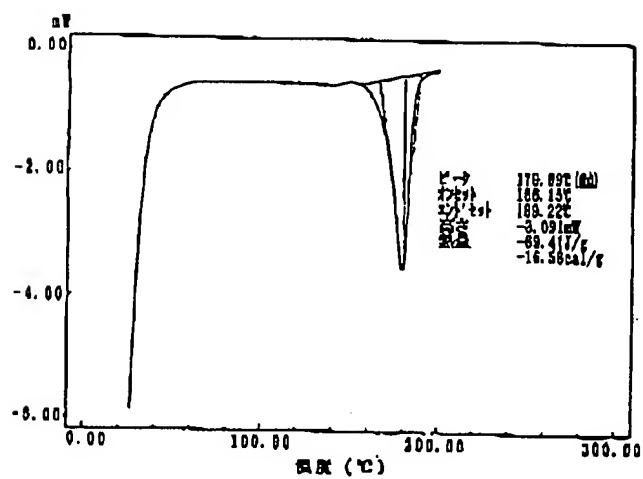
【図4】



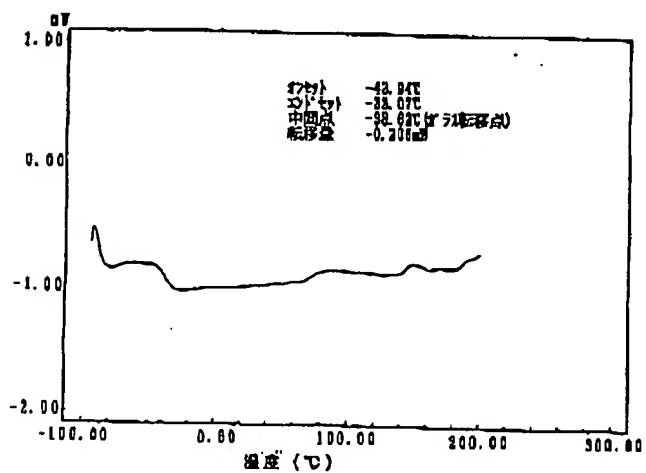
(15)

特開平7-82352

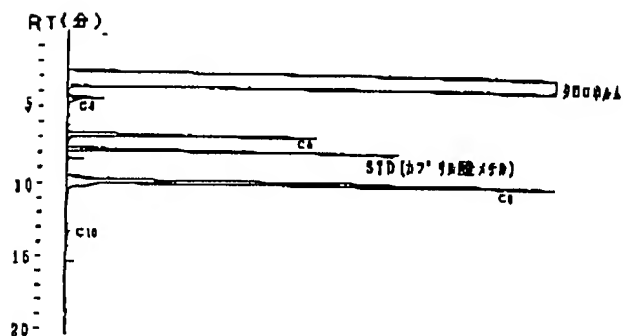
【図7】



【図8】



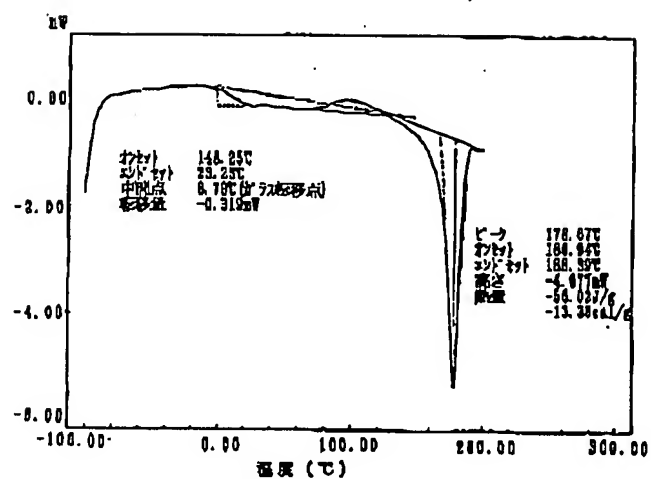
【図10】



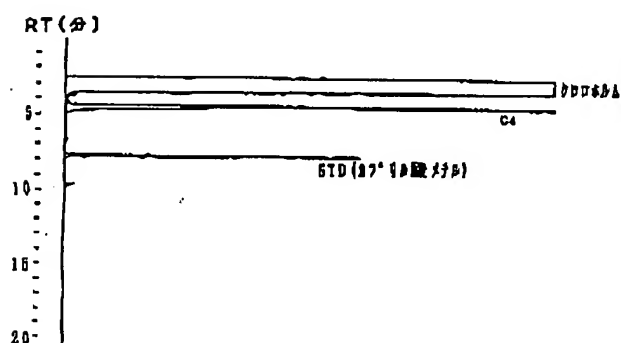
(16)

特開平7-82352

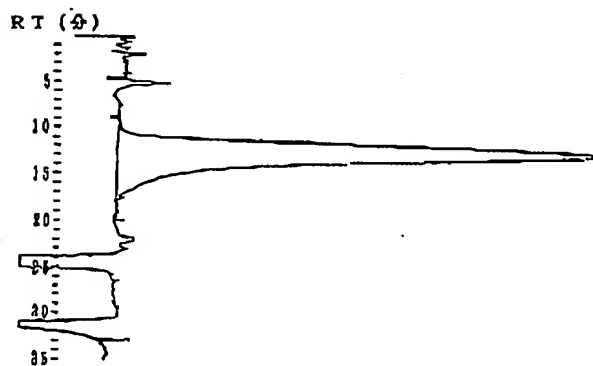
【図9】



【図11】



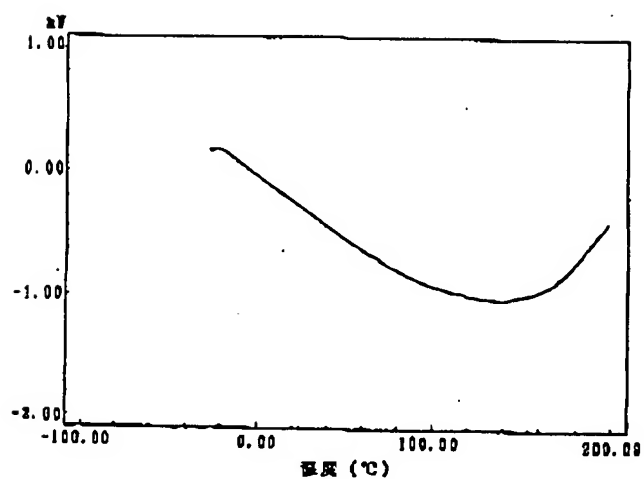
【図12】



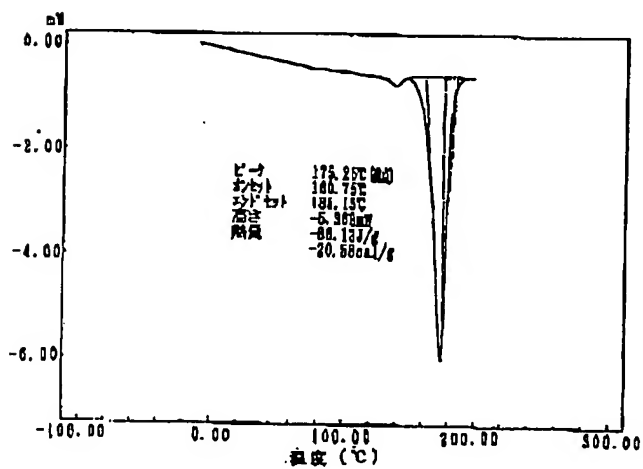
(17)

特開平7-82352

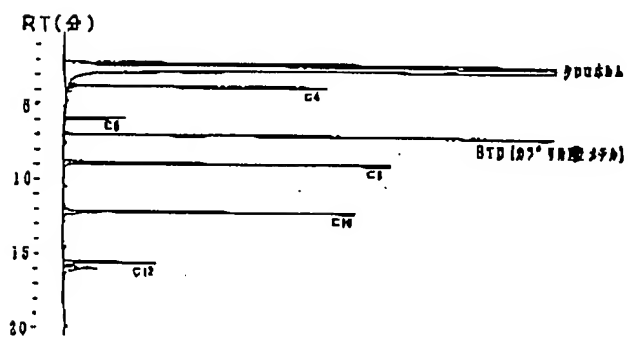
【図14】



【図15】



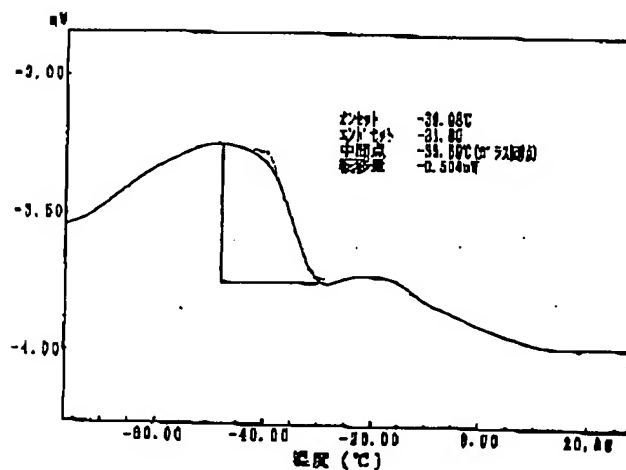
【図18】



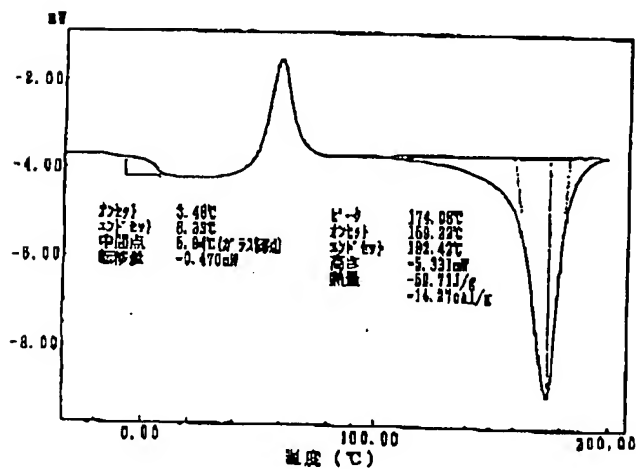
(18)

特開平7-82352

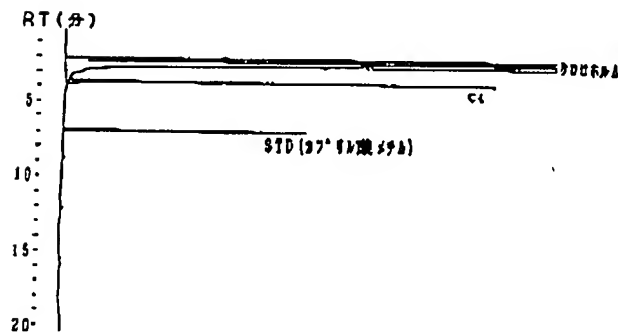
【図16】



【図17】



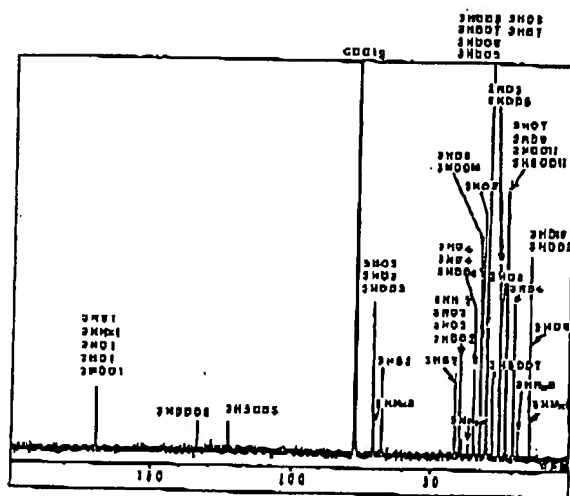
【図19】



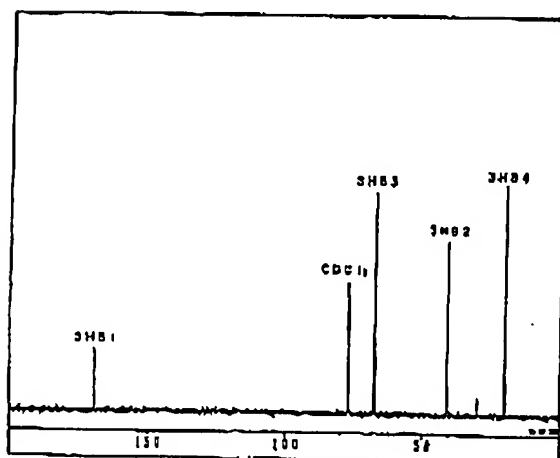
(18)

特臨平7-82352

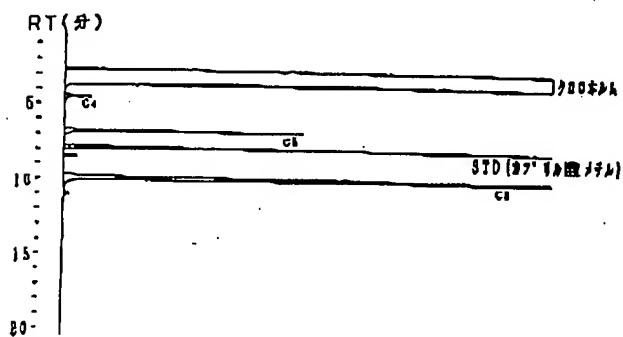
【図20】



【図21】



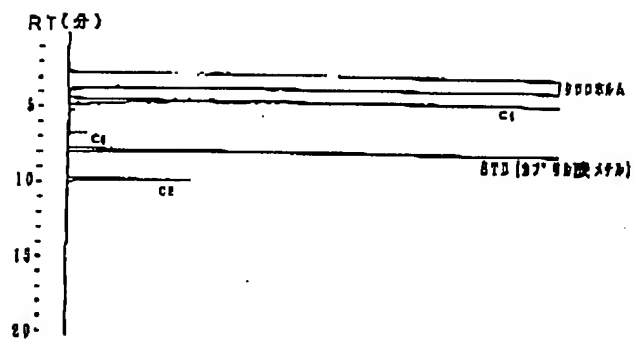
【図22】



(20)

特開平7-82352

【図23】



フロントページの続き

(5) Int. Cl.

(C12P 7/62

C12R 1:38)

識別記号

庁内整理番号

FI

技術表示箇所

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☒ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:**

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**